Evaluierung des vollautomatischen Hämatologiegerätes Celltac alpha im klinischen Einsatz bei Hund und Katze

Von

Barbara Jane McDaniel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Evaluierung des vollautomatischen Hämatologiegerätes Celltac alpha im klinischen Einsatz bei Hund und Katze

von

Barbara Jane McDaniel

aus Ansbach

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haus- und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

Mitbetreuung durch: Dr. med. vet. Karin Weber

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Korreferent:/en:	Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
$\overline{x}$	x-Bar; Mittelwert der ersten und zweiten Zählung
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BASO	Basophil; basophiler Granulozyt
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
CV	coefficient of variation; Variationskoeffizient
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraacetat
F1-4	Flags 1-4; Fehlermeldungen 1-4
fL	Femtoliter (10^{-15} Liter)
GR	Granulocyte; Granulozyt
GRAN	Granulocyte; Granulozyt
HFR	High-Fluorescence Reticulocyte
HGB	Hämoglobinkonzentration
HiCN	Hämoglobinzyanid
ICSH	International Council for Standardization in Hematology
k	Anzahl der Tage
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
L&J	Levey und Jennings
LED	light-emitting diode, Leuchtdiode
LFR	Low-Fluorescence Reticulocyte
LI	lobularity index; Grad der Lobularität
LY	Lymphocytes; Lymphozyten
LYM	Lymphocytes; Lymphozyten
MCH	mean cell hemoglobin; Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration; mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenmasse
MCV	mean cell volume; mittleres Erythrozyteneinzelvolumen

MFR	Medium-Fluorescence Reticulocyte
MONO	Monocytes; Monozyten
MPV	mean platelet volume; durchschnittliches Thrombozytenvolumen
n	Fallzahl
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
NH4CL	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
PCT	plateletcrit; Thrombocrit
PCV	packed cell volume; im weiteren Sinne Synonym für Hämatokrit
PDW	platelet distribution width
PLT	Platelet; Thrombozyten
R	Differenz der ersten und zweiten Zählung
r	Korrelationskoeffizient
RBC	red blood cell; Erythrozyt
RDW	red blood cell distribution width; Erythrozyten Verteilungsbreite
RET	reticulocytes; Retikulozyten
RNS	Ribonukleinsäure
SLS	sodium-lauryl-sulfate; Natriumlaurylsulfat
SOP	Standard Operating Procedure; Standardvorgehensweise
VK	Variationskoeffizient
WBC	white blood cell
WBC-DIFF	white blood cell differential; Differentialblutbild
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Im medizinischen Alltag ist im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung die Blutanalyse nicht mehr wegzudenken. Ob in der Tiermedizin oder Humanmedizin, einer der ersten internistischen diagnostischen Schritte beinhaltet das große Blutbild. Die Rahmenbedingungen, die für diese Analyse gelten, sind jedoch in der Veterinärmedizin sehr heterogen. Somit benötigen Forschungseinrichtungen Geräte, die Proben mit einem hohen Durchsatz präzise bearbeiten können und ein breites Spektrum an messbaren Parametern bieten, während die Bedürfnisse des praktizierenden Tierarztes bei geringen Kosten, Schnelligkeit und Verlässlichkeit liegen.

Aufgrund der vielfältigen Faktoren, die bei der Anschaffung eines hämatologischen Analysegerätes zu beachten sind, verfügen nicht alle Praktiker der Kleintiermedizin über solche Geräte. Zu berücksichtigen sind hierbei Anschaffungskosten, Wartungs-, Reagenzien- und Qualitätskontrollkosten sowie Schulungsaufwand des Praxispersonals. Aus diesem Grund verzichten manche Praktiker entweder ganz auf die hämatologische Diagnostik, evaluieren die Proben mittels manueller Methoden oder versenden die Proben an kommerzielle Labore und beauftragen diese mit der Analyse.

Die technische Ausstattung der hämatologischen Analysegeräte wird stets weiterentwickelt und damit werden mehr Messsicherheit und Messmöglichkeiten im Sinne verschiedener Parameter geboten. Die gesteigerten technischen Möglichkeiten führen allerdings zu höheren Anschaffungskosten. Die Anforderungen in Bezug auf Zuverlässigkeit und Genauigkeit, die an ein hochwertiges Gerät gestellt werden, können nicht im selben Maß an einfachere und damit günstigere Geräte gestellt werden.

Vor allem in der Veterinärmedizin hat die Auswahl an voll- und halbautomatischen Hämatologiesystemen in den letzten Jahren stark zugenommen. Diese leiten sich überwiegend von humanmedizinischen Geräten ab und verfügen über Softwarepakete, die auf verschiedene Tierarten zugeschnitten sind. Die Parameter und Messschwellen dieser Geräte werden größtenteils anhand von Proben gesunder Versuchstiere eingestellt, wobei speziesspezifische Referenzwerte gelten. Die Evaluierung im klinischen Umfeld anhand

physiologischer sowie pathologischer Blutproben ist erforderlich, um den zuverlässigen Einsatz bei Patienten zu gewährleisten. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Genauigkeit und Richtigkeit der Messungen des vollautomatischen Hämatologiesystems Celltac alpha (MEK 6450, Hersteller Nihon Khoden, Tokyo Japan) im klinischen Einsatz in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Patientenproben von Hunden und Katzen im Vergleich mit dem mehrfach klinisch validierten Sysmex XT2000iV zu validieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Analysegeräte und Messmethoden

Seit über 80 Jahren stehen der medizinischen Diagnostik automatische Geräte zur Blutzellzählung zur Verfügung. Methodisch wurden die Geräte kontinuierlich weiterentwickelt, wobei sich manche der Messmethoden nicht etablieren konnten. Dazu zählt beispielsweise die Methode, die den Grad der Trübung einer Blutprobe in ein direktes Verhältnis zur Zellzahl setzt (Weiss et al. 2010). In Gegensatz dazu steht die Methode von Coulter Electronics, einem Vorreiter der zuverlässigen Analysemethoden. Bereits in den fünfziger Jahren brachte Coulter Electronics Geräte auf den Markt, die einen oder mehrere Blutparameter analysieren konnten. Die darin verwendete Messmethode basierte auf elektrischem Widerstand. In den 70er Jahren wurden von Ortho Diagnostik Systems Geräte vermarktet, welche hydrodynamische Fokussierung an Laser-Streulicht als Messmethode zur Zellzählung koppelten (Stiene-Martin et al. 1998). Nachdem die Anzahl der Zellen gemessen werden konnte, wurden Methoden zur Differenzierung der Zellen erforscht. Dazu zählen entweder in Kombination oder allein:

- elektrischer Widerstand
- selektive Lysierung bestimmter Zelltypen
- Trennung nach Zelldichte
- zytochemische Färbeverfahren
- Streulichtmessung.

Automatische Geräte arbeiten mit mindestens zwei dieser Methoden in separaten Kanälen (Bain and Huhn 1997). So verfügt ein Gerät über mindestens einen Kanal zur Erythrozytenzählung und einen zur selektiven Lyse der Erythrozyten wonach dann Leukozyten bestimmt werden können. In den nachfolgenden Absätzen soll näher auf diese Methoden eingegangen werden. Um die Bestimmung von Retikulozyten durchzuführen würde ein weiterer separater Kanal benötigt werden.

1.1. Impedanzmethode

Diese Messmethode basiert auf elektrischem Widerstand und wird daher als Widerstands- oder Impedanzmethode bezeichnet. Es ist die bislang beständigste Methode zur Blutzellzählung und -differenzierung, die entweder alleine oder in

Kombination mit anderen Verfahren eingesetzt wird und wurde in den 50er Jahren von Wallace Coulter entwickelt und von Coulter Electronics Inc. patentiert (Stiene-Martin et al. 1998).

Bei der Impedanzmethode wird eine Blutprobe in einer Elektrolytlösung suspendiert. Diese Mischung wird zunächst durch eine Messöffnung gesaugt, an der zwei Elektroden angrenzen. Die Zellsuspension wird mit einer sogenannten Mantelstrom-Flüssigkeit vermischt. Für die Bearbeitung von Säugetierproben ist dies meistens phosphatgepufferte Kochsalzlösung. Durch die hydrodynamische Fokussierung, die dazu führt, dass der Strom, in dem sich die zu analysierende Probe befindet, unter höherem Druck steht als die Mantelstrom-Flüssigkeit, entsteht koaxialer Strom. Dieser Prozess ermöglicht die singuläre Passage von Zellen zu jeweils einem Zeitpunkt zwischen den Elektroden einer Messkammer. Die Zelle leitet im Gegensatz zum Medium in dem sie sich befindet Elektrizität schlecht. Es kommt zu einem Anstieg des Widerstandes, der proportional zum Zellvolumen ist. Dadurch ändert sich der Leitwert in Abhängigkeit der für eine Zellgruppe spezifischen Leitfähigkeit. Dieser Impuls ist direkt proportional zu der Zellgröße, während die Anzahl an Unterbrechungen die Anzahl der Zellen widerspiegelt (Bain and Huhn 1997). Der Widerstand, die induktive Spannung und die Kapazität bestimmen die Impedanz in der Messzelle. Damit diese Zählung und Größenbestimmung akkurat verlaufen kann, sind sogenannte Schwellenwerte erforderlich. Ein Schwellenwert stellt eine Spannungsgrenze dar. Wenn diese überschritten wird, wird das auslösende Partikel wahrgenommen und dessen Größe gemessen. Es besteht die Möglichkeit die Schwellenwerte, obere sowie untere, zu manipulieren, um eine Zielspannweite zu erzeugen, die sich nach den Partikelgrößen richtet und in der Veterinärmedizin speziesspezifisch definiert werden muss. Eine Koinzidenzkorrektur soll anhand eingebauter Stromkreise falsche Zellzählungen kompensieren, die durch simultane Zellpassage durch die Messöffnung entstehen könnten.

Vor allem impedanzbasierte Messgeräte, die Zellen anhand der Größe differenzieren, können nur bedingt speziesspezifische Besonderheiten der Morphologie der Blutzellen kompensieren. Dies betrifft in der Kleintiermedizin an erster Stelle Thrombozyten der Katze. Die echte Thrombozytopenie bei Katzen hat eine geringe Prävalenz (Norman et al. 2001a), dennoch wird diese labordiagnostisch häufig festgestellt. Diese Fehldiagnose beruht auf der

Morphologie der Thrombozyten bei Katzen: die Zellgröße der Thrombozyten und die der Erythrozyten überschneiden sich. Somit kann keine akkurate Trennung der Zellpopulationen festgelegt werden und Thrombozyten werden als Erythrozyten gezählt. Ein weiteres Problem, das bereits während der Probenaufbereitung entsteht, ist die in vitro Aggregation der Thrombozyten. Aggregate können nicht als einzelne Thrombozyten erkannt werden, sondern werden als eine große Zelle gezählt (Zelmanovic and Hetherington 1998).

Um die Messsicherheit zu erhöhen, wird bei einer Vielzahl der modernen Messgeräte die Methode der Impedanz mit neueren Methoden wie der Fluoreszenz Durchflusszytometrie verbunden. Ein Beispiel hierfür ist der Sysmex XE-2100.

1.2. Selektive Lyse bestimmter Zelltypen

Die selektive Lyse bestimmter Zelltypen ermöglicht die Auswahl einer Zellgruppe und somit deren Analyse. Die dafür benötigten Reagenzien greifen an physiologischen Strukturen, die Zelltypen voneinander abgrenzen und unterscheiden, an.

Die vollständige Lyse von Erythrozyten ist ein Kernelement im Prozess der Untersuchung einer Blutprobe. Die Lyse ist notwendig für die Quantifizierung des Hämoglobins oder die Differenzierung der Leukozyten. Die Lyse von Erythrozyten ist mit verschiedenen Substanzen und Methoden möglich:

- Ammoniumchlorid (NH4Cl)
- Diethylenglykol
- Saponine
- Hypotonischer Schock.

Die Entfernung des Zytoplasmas, wie es bei der Differenzierung der Leukozyten angewandt wird, stellt eine unvollständige Lyse der Zellen dar. Dabei wird die Klassifikation des Leukozyten erst anhand des freigelegten Nukleus möglich. Die Struktur des Nukleus oder die Differenzierung der basophilen Leukozyten erfolgt beim ADVIA 120 (Bayer Health Care) durch die Lyse der Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) gefolgt von der Entfernung des Zytoplasmas mittels Phtalsäure, einem Tensid in Kombination mit erhöhter Temperatur in einer

Reaktionskammer. Die Klassifizierung des Leukozyten als mononuklear oder polymorphonuklear erfolgt durch Streulichtmessung (Bayer Health Care 2004).

Die Annahme der unterschiedlichen Lyseresistenzen zur Differenzierung der basophilen Granulozyten (BASO) von anderen Leukozyten (WBC) basiert auf Eigenschaften menschlicher basophiler Granulozyten. Dass diese nicht ohne Adaptionen für Blutproben von Tieren übernommen werden können, zeigte sich in einem Versuch mit Cell-Dyn 3500, ADVIA 2120 und dem Sysmex XT2000iV. Keines der Geräte konnte basophile Granulozyten im veterinärmedizinischen Bereich zuverlässig erkennen (Lilliehöök and Tvedten 2011). Weitere Auswertungen sind ebenfalls nur für Proben menschlichen Bluts möglich. Beispielsweise berichtet der ADVIA 120 neben dem WBC und BASO count aus dem oben beschriebenen Kanal auch den Lobularity Index (LI) oder dem Grad der Lobularität, der die Abgrenzung von mononuklearen und polymorphonuklearen Leukozyten darstellt. Bei einer Linksverschiebung ist eine Abgrenzung nicht möglich und eine dementsprechende Meldung des Gerätes erfolgt. Auch diese Funktion ist nur mit menschlichen Proben möglich.

1.3. Quantitative Buffy-Coat-Analyse

Die Buffy-Coat-Analyse nutzt die unterschiedlichen Zelldichten der Blutbestandteile. Die in den 80er Jahren von Wardlaw und Levine entwickelte Methode misst nicht die Zellzahl anhand der einzelnen Zellen, sondern analysiert die verschiedenen Zellschichten, die aufgrund unterschiedlicher Zelldichten beim Zentrifugieren der Blutprobe entstehen. Die mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure oder Ethylendiamintetraacetat) antikoagulierte Blutprobe wird in einer Hämatokritkapillare (bei 10.500 Umdrehungen/Minute für fünf Minuten) zentrifugiert. Dabei sorgt ein beweglicher Kunststoffschwimmer dafür, dass der Buffy Coat künstlich ausgedehnt wird. Der Buffy Coat enthält Leukozyten (unterteilt in Granulozyten und Nicht-Granulozyten) und Thrombozyten und stellt die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma dar. Die Kapillare enthält den Farbstoff Akridin Orange der nach Bindung an Nukleoproteine (Jackson 1961) sowie Glyskosaminoglykane oder Lipoproteine der Leukozyten und Thrombozyten bei Beleuchtung mit violettem Licht (460 nm) einen Zelltyp-spezifisches Licht emittiert. Leukozyten, die keine Granula besitzen (Lymphozyten (LYM), Monozyten (MONO)) emittieren grünes Licht. In Granulozyten (GRAN) bindet Akridin Orange an Glykosaminokykane der

Granula und führt zu orange emittiertem Licht und Thrombozyten werden als gelb fluoreszierend wahrgenommen (Wardlaw and Levine 1983). Um eine bessere Abgrenzung der unteren Granulozytenschicht zur RBC-Schicht zu gewährleisten, werden die Erythrozyten mit Kaliumoxalat geschrumpft und dadurch die RBC-Schicht kondensiert. Die Stärke der Fluoreszenz wird mit einem elektronischen Mikrometer, kombiniert mit einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet und gibt Aufschluss über das Verhältnis der verschiedenen Zelltypen. Die Schichtdicke der einzelnen Zellschichten steht im direkten Verhältnis zu den Zellzahlen (Jain 1993). Dieses Messprinzip findet auch in vollautomatischen Hämatologiesystemen, wie dem QBC-VetAutoread Hämatologiesystem (IDEXX Inc., Westbrook, USA) Anwendung.

1.4. Zytochemische Färbeverfahren

Zytochemische Färbeverfahren stellen einen integralen Teil der Abläufe eines vollautomatischen Hämatologiesystems dar. Je nach verwendetem Farbstoff und Zellstruktur an welche dieser bindet, emittieren Zellen eine für den jeweiligen Zelltyp und Farbstoff spezifische Fluoreszenz. So wird beispielsweise die Messung der DNA Menge in einer Zelle durch Farbstoffe wie DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol), Polymethin- Fluoreszenzfarbstoff oder Propidiumiodid ermöglicht. In der Durchflusszytometrie wird die Fluoreszenz in Kombination mit Streulichtmessung eingesetzt, um Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden.

Eine weitere Methode, die Peroxidase-Reaktion, wurde ursprünglich in dem Gerät Technicon D-90 (95) (Bayer Health Care) verwendet, um ein fünfteiliges Differentialblutbild zu erstellen. Der Advia 120 (Bayer Health Care) sowie die Technicon H Geräteserie (H*1, H*2, H*3 und H-6000) basieren auf dieser Technik, bei der im Rahmen der Leukozytendifferenzierung Zellen anhand der granulären Peroxidaseaktivität differenziert werden. Das Substrat 4-Chlor-1-naphthol wirkt auf die Zellen ein und es entsteht ein schwarzer Farbstoff, der Licht absorbiert. Dieser Farbstoff entsteht durch die Ausfällung von Wasserstoffperoxid an Orten der Peroxidaseaktivität, in Granula der Leukozyten. Die Lichtabsorption ist proportional zur Intensität der Peroxidase-Reaktion. Bei den meisten Tierarten weisen Lymphozyten eine geringe Aktivität auf, während eosinophile Granulozyten die höchste Peroxidaseaktivität aufweisen.

1.5. Streulichtmessung

Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung und die darauffolgende Zellzählung und Analyse der Zellen als Abfolge der Vorgänge in der Impedanzmessung wird prinzipiell ebenfalls bei der Streulichtmessung angewandt. Hierbei verursachen Zellen, die in einer Durchflusszelle einzeln einen Lichtstrahl durchqueren eine Brechung oder Beugung und Streuung des Lichts. Als Lichtquelle werden z.B. Laser, Argon- oder Xenonlampen verwendet. In älteren Geräten wurden auch Quecksilber- oder Halogenlampen verwendet. Das abgeleitete Licht wird mittels strategisch angebrachten Photodetektoren erfasst. Es gibt zwei verschiedene Methoden um das gestreute Licht zu erfassen: die Dunkelfeld optische Methode und anhand eines Adsorptionskanals. Das erfasste abgeleitete Licht wird als Vorwärts- bzw. Niedrigwinkelstreulicht, oder Seitwärts- bzw. Großwinkelstreulicht klassifiziert und ermöglicht die Trennung einzelner Zellpopulationen (Dotson 1998) Die Intensität des Vorwärts-Niedrigwinkelstreulichts (1-3°) ist proportional zur Zellgröße. Vorwärts-Großwinkelstreulicht (4-9°) gibt Auskunft über die Granularität der Zelle, wogegen Seitwärtsstreulicht (90°) von der inneren Beschaffenheit und Struktur der Zelle abgängig ist.

Eine Steigerung der Aussagekraft wird durch Fluoreszenz ermöglicht. Hierbei wird ein zusätzlicher Parameter festgehalten: das Seitwärtsfluoreszenzlicht, welches den Gehalt an Nukleinsäuren sowie Zellorganellen angibt (Sysmex 2008). Diese Methode wird z.B. in Geräten der Sysmex X-Klasse verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff Polymethin, bei Sysmex XT2000iV Stromatolyser 4DS, dringt durch eine Reihe an Reaktionen in die Zellen ein. Dort bindet der Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff an die RNS oder DNS im Zellkern oder Zytoplasma der jeweiligen Zelle und führt so zu einer Aussage über den Reifegrad und die Zellaktivität. Genauere Informationen zum Sysmex XT2000iV werden in Abschnitt 3 dargestellt.

Die Methode der RNS-Färbung wird ebenfalls zur Zählung der Retikulozyten verwendet. Hierbei kann die Färbung von RNS über Fluorochrome erfolgen, so dass die Fluoreszenz im Durchflusszytometer erfasst werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Färbung mithilfe von nicht-fluoreszierenden Farbstoffen wie Methylenblau oder Oxazin 750, so dass Retikulozyten über den Grad der Lichtabsorption erkannt und gezählt werden können. Retikulozyten werden dann

durch Größe und Lichtabsorption oder -intensität der Fluoreszenz von Leukozyten abgegrenzt. Der Reifegrad der Retikulozyten steht im proportionalen Verhältnis zur Intensität der Nukleinsäuren-Färbung oder Fluoreszenz und somit der vorhandenen Menge an RNS. Informationen über den Reifegrad der Retikulozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl der Erythrozyten ermöglicht Rückschlüsse über die Art der Erkrankung.

1.6. Hämoglobin-Messmethode

Seit dem 23. August 1966 empfiehlt das ICSH (International Council for Standardization in Hematology) die Zyanmethämoglobin-Methode als Referenzmethode für die Erfassung der Hämoglobinkonzentration (ICSH 1967). Dabei erfolgt eine photometrische Bestimmung von Hämoglobinzyanid (HiCN). Die Blutprobe wird 1:251 verdünnt mit Kaliumzyanid und Kaliumferrizyanid. Es entsteht Methämoglobin. Die Hinzugabe von Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) führt zur Senkung des pH-Werts und führt zur Beschleunigung der Reaktion, so dass ein Ergebnis bereits nach 3 Minuten erfasst werden kann. Das Hinzufügen eines nicht-ionischen Detergens beschleunigt die Lyse der Erythrozyten und verringert den Grad der Trübung durch Senkung der Lipoproteinämie. Die Nutzung eines Filters mit der Porengröße von 0,2 - 0,25µm reduziert das Risiko falscher Ergebnisse durch die Entfernung etwaiger Partikel. Die Probe wird anschließend bei 540 nm photometrisch gemessen, indem das transmittierte Licht von einer photoelektrischen Zelle aufgefangen wird.

Diese Methode hat den deutlichen Nachteil, dass dafür die toxische Substanz Zyanid als Verbrauchsstoff erforderlich ist. Dennoch können damit drei Formen von Hämoglobin einschließlich Carboxyhämoglobin und Methämoglobin erfasst und in Zyanmethämoglobin umgewandelt werden. Ebenso bestehen für diese Methode standardisierte und von dem ICSH anerkannte Substanzen für die Eichung (Zwart et al. 1996). Aufgrund der breiten Absorptionsbande von Zyanmethämoglobin bei 540nm ist die Messung mit diversen Photometern möglich und führt somit dazu, dass diese Methode auch mit unterschiedlicher Ausstattung durchgeführt werden kann. Zyan-freie Methoden wurden analysiert und inzwischen auch in automatischen Analysegeräten und tragbaren Hämoglobinometern umgesetzt. Zwei Beispiele hierfür sind die Verwendung von Natriumlaurylsulfat oder die Umwandlung zu Azidmethämoglobin durch Zusatz von Natriumazid und Natriumnitrat.

2. Celltac

Der Celltac alpha MEK-6450 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) ist ein neues, auf der Impedanzmethode basierendes Hämatologiesystem, das mit einer Software für die Anwendung in der Veterinärmedizin ausgestattet ist. Im offenen Modus werden 30µl Blut für die Analyse verwendet. Die Messung im Kapillar-Modus ist ebenfalls verfügbar. Dabei kann zwischen einer Probengröße von 10 oder 20µl gewählt werden. Mit der derzeitigen Software (Version 2009- heute) werden für die Tierarten Hund, Katze, Pferd und Rind 20 Parameter ausgewiesen. Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration sowie ein vierteiliges Differentialblutbild (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten) werden gemessen. Es werden drei Histogramme erstellt: RBC, PLT und WBC. Daraus werden automatisch RDW (RBC distribution width), MCV (mean cell volume; mittleres Erythrozyteneinzelvolumen), PCT (platelet crit; Thrombocrit), MPV (mean platelet volume; durchschnittliches Thrombozytenvolumen) und PDW (platelet distribution width) abgeleitet. MCH (mean cell hemoglobin; Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten) und MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration; mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenmasse) werden anschließend berechnet. Die x-Achse der Histogramme stellt die Zellgröße und die y-Achse die Zellzahl dar. Die Referenzbereiche können manuell angepasst werden, so dass der Verweis auf Über- oder Unterschreitung bestimmter Parameter den hauseigenen Referenzbereichen entspricht.

Bei der Erfassung der Granulozyten kann nicht zwischen neutrophilen und basophilen Granulozyten unterschieden werden. Für die Tierarten Kaninchen und Ratte stehen dieselben Parameter bis auf das Differentialblutbild zur Verfügung.

Der MEK-6450 verwendet Verdünnungsmittel, Reinigungsmittel und Hämolysin, vertreten durch die folgenden vier Reagenzien:

- ISOTONAC 3 Diluent
- CLEANAC Detergent
- CLEANAC 3 Detergent
- Hemolynac 3N Lysing Reagent

CLEANAC wird zur regelmäßigen Reinigung des Gerätes eingesetzt, während CLEANAC 3 für die Strong Clean Funktion, zur Wartung des Gerätes eingesetzt wird.

2.1. WBC Count

Im WBC Modus wird die Zellmembran der Leukozyten und Erythrozyten lysiert. Anschließend werden die Zellkerne der Leukozyten gezählt. Falls Proben von Tieren mit kernhaltigen Erythrozyten (z.B. Reptilien, Vögel) analysiert werden, deren Zellkerne in diesem Modus nicht lysiert werden können, ist das Ergebnis der Leukozytenmessung als nicht belastbar zu werten.

Ebenfalls beeinflussen manche Krankheitsbilder (z.B. Hepatophathien) und artspezifische Eigenschaften die Lyseresistenz der Erythrozyten.

2.2. PLT Count

Thrombozyten und Erythrozyten werden anhand Größenunterschiede bei der Impedanzmethode voneinander differenziert. Bereits die Bedingungsanleitung des MEK-6450 weist auf die Gefahr der Pseudothrombozytopenie bei der Thrombozytenmessung hin. Da es Überschneidungen bei der Größe von Thrombozyten und Erythrozyten, besonders bei Katzen gibt, werden Zellen inkorrekt zugeordnet. So wird zwar in der Laborauswertung eine Thrombozytopenie aufgezeigt, diese aber als Pseudothrombozytopenie einzuordnen ist. „Echte“ Thrombozytopenie ($< 200 \times 10^3$ Zellen/µL) ist selten, wie in einer retrospektiven Analyse von n = 3300 Katzen gezeigt wurde, in der nur n = 41 (1,2%) der Katzen eine "echte" Thrombozytopenie hatten (Jordan et al. 1993). Mittels Impedanzmethode wurden in einem weiteren Versuch mit n = 359 Katzen allerdings eine Rate von 71% Thrombozytopenie erhoben. Nach manueller Zählung in diesem Versuch zeigten allerdings nur n = 11 Proben (3,1%) tatsächlich einen Thrombozytenwert von $< 200 \times 10^3$ Zellen/µL (Norman et al. 2001b).

In vitro Aggregatbildung, die durch die unsachgemäße Blutentnahmetechnik gefördert werden kann, erschwert die korrekte Erfassung der Anzahl an Thrombozyten zusätzlich. Die Aggregate werden als große Zellen erkannt und fälschlicherweise anderen Zellgruppen zugeordnet – diese Zellzahlen fehlen im PLT Count wodurch die Zahl an Thrombozyten geringer dargestellt wird. Manuelle Kontrollen mithilfe eines Blutausstriches sollten bei angezeigter

Thrombozytopenie durchgeführt werden. Der Wert, der eine „Thrombozytopenie“ Meldung hervorruft, sowie die klinikintern verwendeten Referenzwerte für andere Parameter können manuell eingegeben werden.

Wird bei einer Probe ein sehr niedriger Thrombozytenwert festgestellt, wird die Probe automatisch erneut analysiert und die Werte RBC, HCT, PLT, MCV, PCT, MCH, MCHC und RDW neu berechnet. Der Schwellenwert, der einen sehr niedrigen Thrombozytenwert darstellt, kann entweder bei 50×10^3/µl oder 100×10^3/µl festgelegt werden.

2.3. RBC Count

Es stehen fünf Verdünnungs-Modi zu Verfügung: normal (10 bis 30 µl abhängig davon, ob im Kapillarmodus gemessen wird), pre-dilution, high (kommt bei sehr hohen WBC Werten zum Einsatz, 10 µl der Blutprobe werden bis zu drei Mal der normalen Verdünnung verdünnt), higher (ebenfalls bei sehr hohen Leukozytenwerten, 5µl der Blutprobe zur sechsfachen der normalen Verdünnung) und low (bei sehr niedriger Leukozyten- oder Thrombozytenanzahl). Bei sehr hohen Werten (über 15.000.000 Gesamterythrozytenanzahl) sollte die Verdünnung der Probe angepasst werden.

Die Software bietet einen „double count“ Modus. Im Gegensatz zur einfachen Messung wird hier die Blutprobe automatisch doppelt analysiert. Es wird dann der Mittelwert beider Analysen gespeichert. Bei einer Abweichung von mehr als 10% wird die Probe automatisch ein drittes Mal gezählt, wobei dann der Mittelwerte der ähnlichsten Werte berechnet und gespeichert wird.

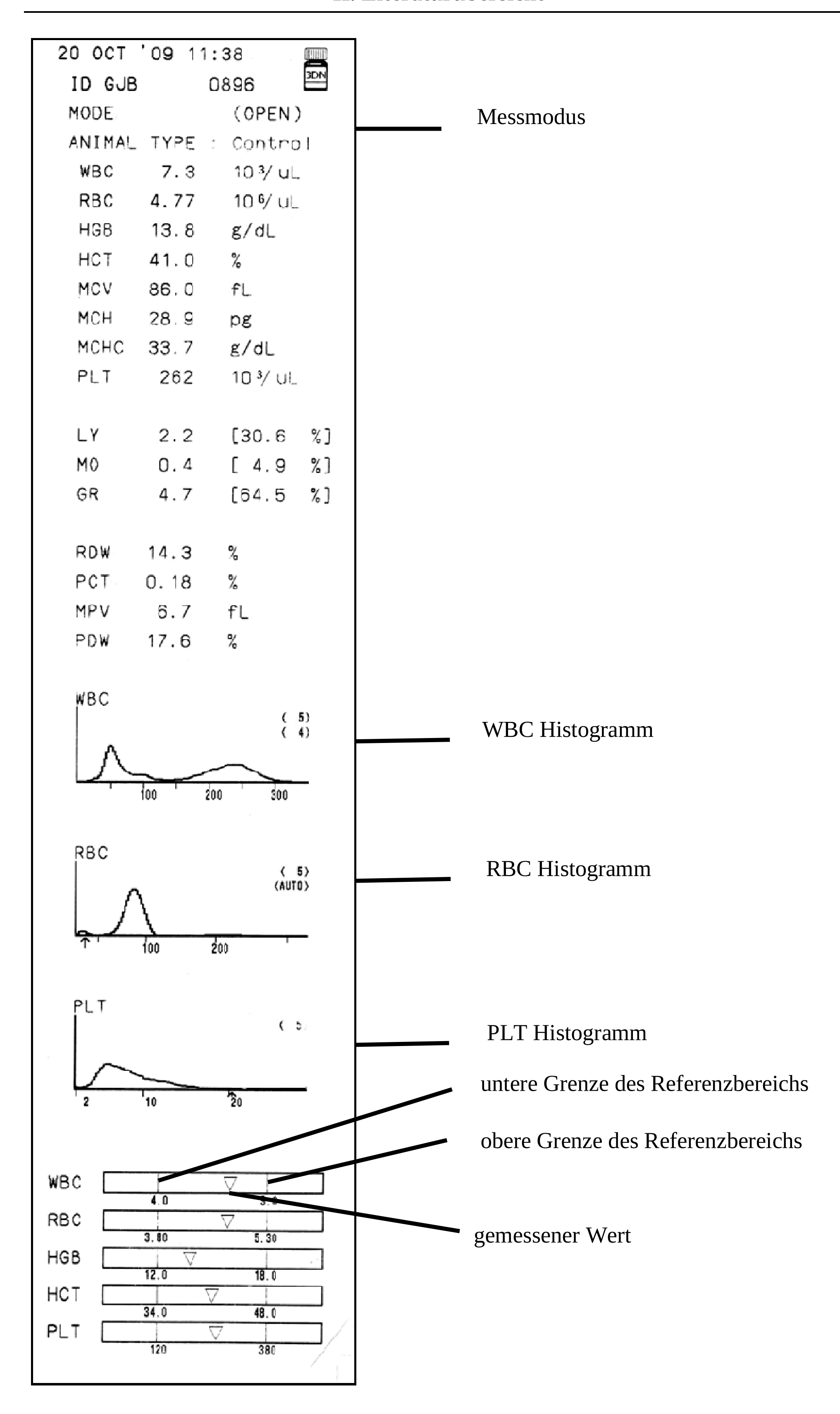


Abbildung 1: Ergebnisausdruck einer Kontrollmessung

2.4. Histogramme

Volumenverteilungskurven werden aus den durch die Zellen verursachten Impulsen abgeleitet und als Histogramme dargestellt (Abbildung 1). An der y-Achse werden die gezählten Werte aufgelistet. Es besteht die Möglichkeit entweder die absoluten Zellzahlen oder die Prozentwerte der Messwerte anzeigen zu lassen. Die x-Achse zeigt das Blutzellvolumen in fL (fL = 1×10^{-15}L). Aus den Histogrammen werden weitere Werte abgeleitet.

2.4.1. RBC Distribution Histogram

RDW (red blood cell distribution width, Verteilungsbreite der Erythrozyten) wird automatisch aus den Daten des RBC Verteilungshistogramms berechnet. Zellzahl und Zellvolumen werden gegenübergestellt und bieten Aufschluss über das Abweichungsverhältnis der Erythrozytenvolumina im Histogramm (Abbildung 2). Die Verteilungsbreite der Erythrozyten erlaubt Rückschlüsse über den Grad der Anisozytose – die Zunahme der Variabilität der Erythrozytengröße, und stellt den Wert des folgenden Quotienten dar.

$$\text{RDW (\%)} = \frac{\text{Standardabweichung des Erythrozytenvolumens (SD)}}{\text{Mittleres zelulläres Volumen (MCV)}}$$

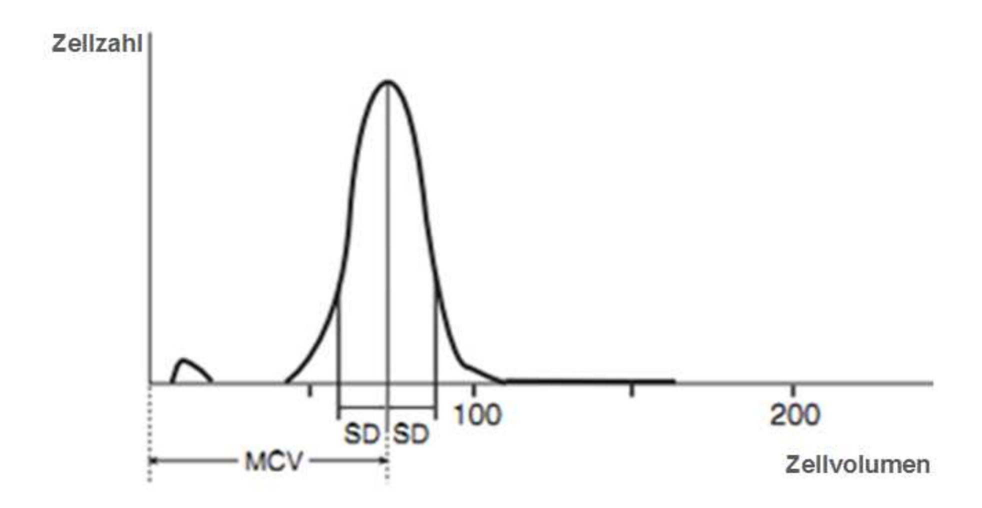


Abbildung 2: RBC Histogramm (nach Benutzerhandbuch)

2.4.2. PLT Distribution Histogram

Aus dem Thrombozyten- Verteilungshistogramm (PLT Distribution Histogram) werden folgende Parameter berechnet: Platelet Crit, Mean Platelet Volume und Platelet Distribution Width.

Das Thrombocrit (Plateletcrit, PCT) stellt das Verhältnis des Thrombozytenvolumens zum aspirierten Blutvolumen dar. Thrombocrit erlaubt Rückschlüsse über die gesamte zirkulierende Thrombozytenmasse und ist der Anteil des Blutvolumens, der aus Thrombozyten besteht. Thrombocrit wird berechnet aus der Anzahl der Thrombozyten und dem mittleren Thrombozytenvolumen. Ein Beispiel für den diagnostischen Wert dieses Parameters wurde durch Tvedten et al. bei der Hunderasse Cavalier King Charles Spaniel gezeigt. Diese Rasse weist eine hohe Prävalenz an einer genetischen Prädisposition für Makrothrombozytopenie (Pedersen et al. 2002) auf. So sind Thrombozyten in reduzierter Anzahl vorhanden und können aufgrund der Makrozytose schlecht von Erythrozyten abgegrenzt werden. Dadurch wird ein höherer Grad an Thrombozytopenie diagnostiziert als durch diese genetische Prädisposition, idiopathisch und regelhaft asymptomatisch, auftritt. Mit Thrombocrit konnte eine Aussage über den Thrombozytenstatus getroffen werden, die für die Klink die höchste Relevanz hatte (Tvedten et al. 2008).

Das mittlere Thrombozytenvolumen (Mean Platelet Volume (MPV)) bietet eine Schätzung der Thrombozytengröße (Abbildung 3) und ist bei manchen Spezies umgekehrt proportional zur Thrombozytenanzahl. Erhöhte Thrombozytenvolumenwerte können allerdings auch ein Artefakt sein, das zum Beispiel durch verlängerte oder verzögerte Exposition der Blutprobe mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure oder Ethylendiamintetraacetat) (McShine et al. 1991) oder einer verzögerten Kühlung der Blutprobe entstehen kann.

Die Spanne der Volumenverteilung der Thrombozyten wird mit dem Parameter Platelet Distribution Width (PDW) aufgezeigt und repräsentiert den Variationsindex der Thrombozytengröße. Dieser Parameter wird in humanmedizinischen Einrichtungen zur Differenzierung der Art der Thrombozytopenie verwendet und könnte in der Veterinärmedizin in Einrichtungen von Nutzen sein, die selten Blutausstriche mikroskopisch analysieren.

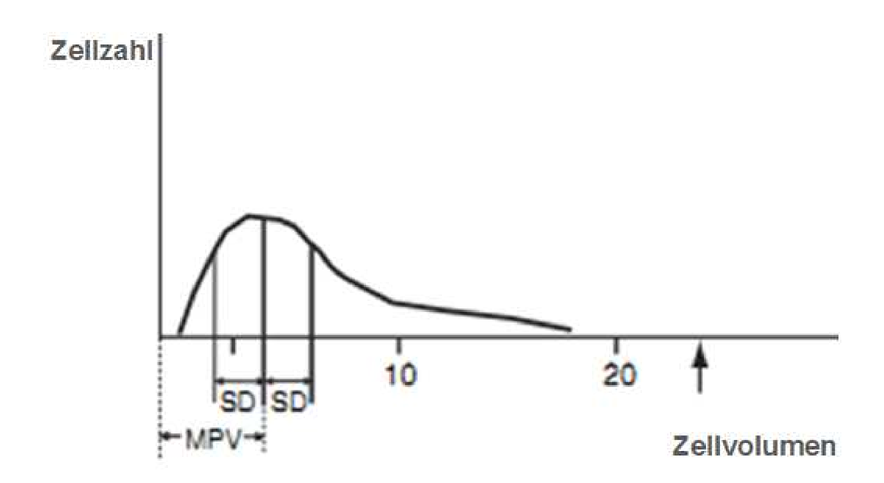


Abbildung 3: PLT Histogramm (nach Benutzerhandbuch)

Bei Blutproben mit physiologischer Verteilung von Zellpopulationen und klarem Unterschied in der Morphologie der Zellen, ist die eindeutige Trennung der PLT Volumenverteilung und der RBC Volumenverteilung (Abbildung 4) möglich. Somit kann theoretisch eine akkurate Zählung der Thrombozyten erfolgen.

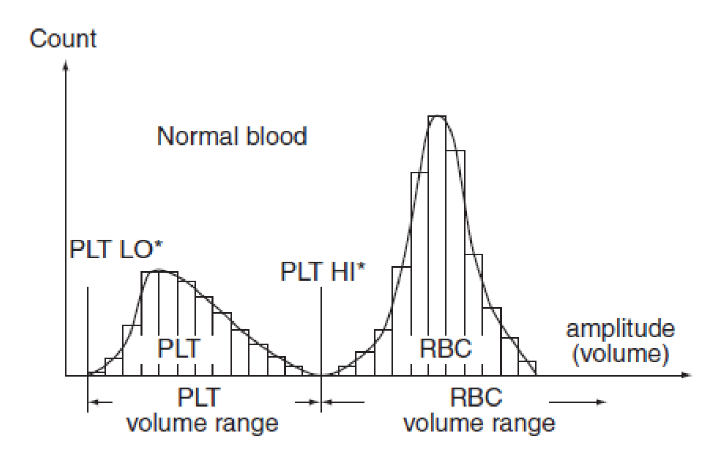


Abbildung 4: Ideale Verteilungskurve unter physiologischen Bedingungen des Histogramms mit Trennung der PLT- und RBC-Populationen (Benutzerhandbuch)

Die, unter physiologischen Umständen, mögliche Abgrenzung der Volumina der Zelltypen kann aufgrund verschiedener Ursachen erschwert werden, mit der Folge, dass sich die Volumenverteilungen der Zelltypen überschneiden (Abbildungen 5 und 6). In diesem Fall ermittelt das Gerät anhand der Verteilungsmuster (gestrichelte Linie) die Überschneidung und die Talsohle und setzt anhand dessen den oberen Schwellenwerte der PLT fest (PLT HI).

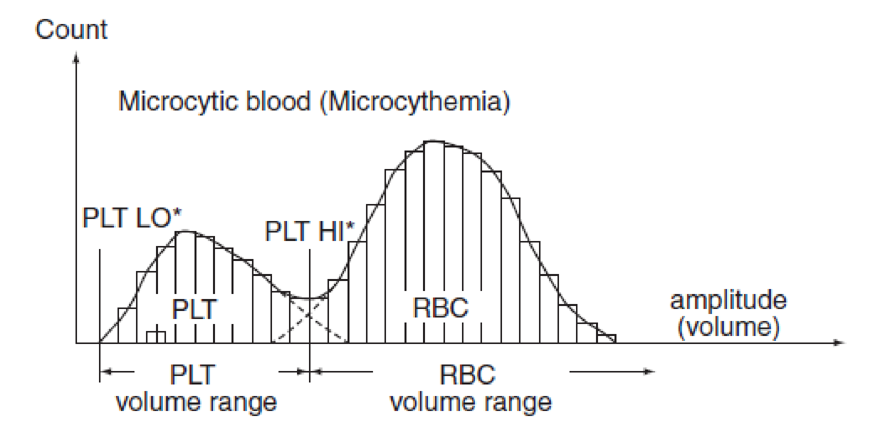


Abbildung 5: Nicht ausreichende Trennung der PLT - und RBC – Population aufgrund Mikrozytose mit errechnetem PLT HI Schwellenwert (Benutzerhandbuch)

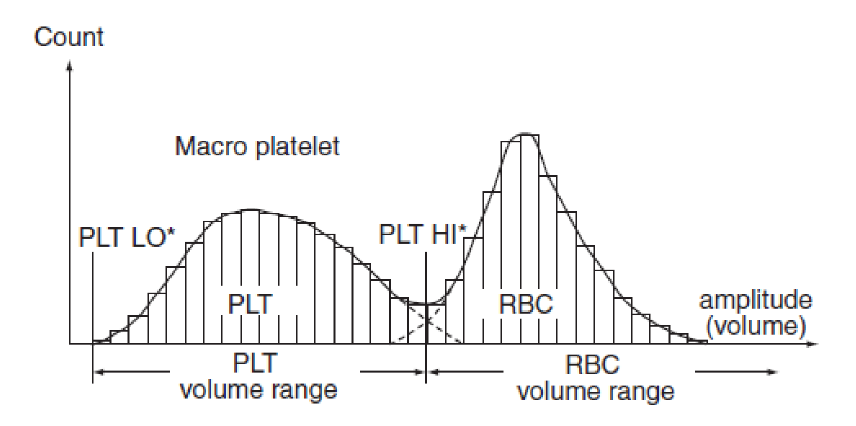


Abbildung 6: Nicht ausreichende Trennung der PLT- und RBC – Population aufgrund Makrozytose mit errechnetem PLT Hi Schwellenwert (Benutzerhandbuch)

Bei reduzierten Thrombozytenwerten sollte eine manuelle Zählung der Thrombozyten zur Kontrolle erfolgen, um Pseudothrombozytopenie auszuschließen (s. Abschnitt 2.2).

2.4.3. WBC Distribution Histogram

Leukozyten werden anhand verschiedener physikalischer Eigenschaften, die nach Entfernung des Zytoplasmas messbar sind, in vier Gruppen eingeteilt: Lymphozyten (LYM), Monozyten (MONO), eosinophile Granulozyten (EOS) und Granulozyten (basophile und neutrophile Granulozyten, GRAN). Die Differenzierung der Leukozyten (white blood cell differential, WBC-Diff) kann für die Tierarten Hund, Katze, Pferd und Rind durchgeführt werden. Es werden sowohl die absoluten Leukozytenzahlen, als auch Prozentwerte einer Population in Relation zur Gesamtleukozytenpopulation angegeben. Das vierteilige WBC - DIFF Histogramm wird anhand der Höhen und Tiefen des Verteilungshistogramms beurteilt (Abbildung 7).

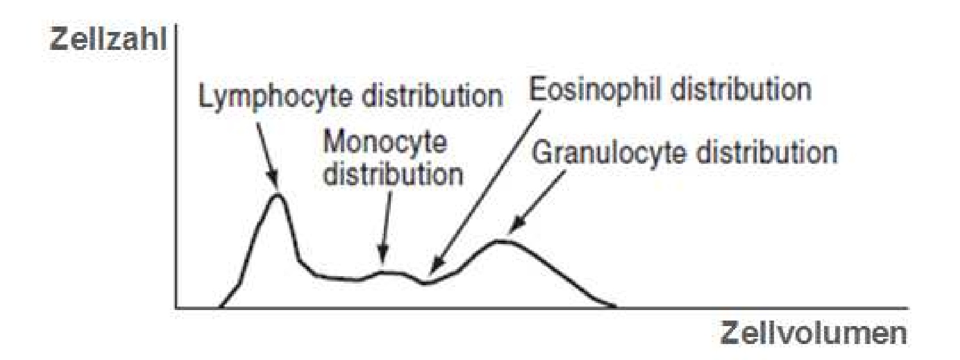


Abbildung 7: WBC Histogramm (nach Benutzerhandbuch)

Untypische Verteilungen der Zelltypen werden im Histogramm durch die Software erkannt. Die Ergebnisse der Messung werden daraufhin als nicht belastbar charakterisiert und eine dementsprechende Fehlermeldung (Flag (F1-F4)) wird angezeigt.

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Fehlermeldungen, die am Gerät angezeigt werden können erläutert:

- F1: RBC Ghost – too many RBC ghost
- F2: Can't analyze LY – Lymphocyte cannot be analyzed
- F3: Can't analyze GR – Granulocyte cannot be analyzed
- F4: Can't diff WBC – WBC cannot be differentiated

F1: Zu viele RBC Rückstände

Zu viele rückständige Erythrozytenmembrane (RBC Ghosts), die nach der Lyse-Phase noch intakt sind, werden im Histogramm als mangelhafte Abgrenzung zur Lymphozytenpopulation dargestellt (Abbildung 8). Zu den möglichen Ursachen gehören eine schlechte Hämolyse, Thrombozytenaggregation und große Thrombozyten.

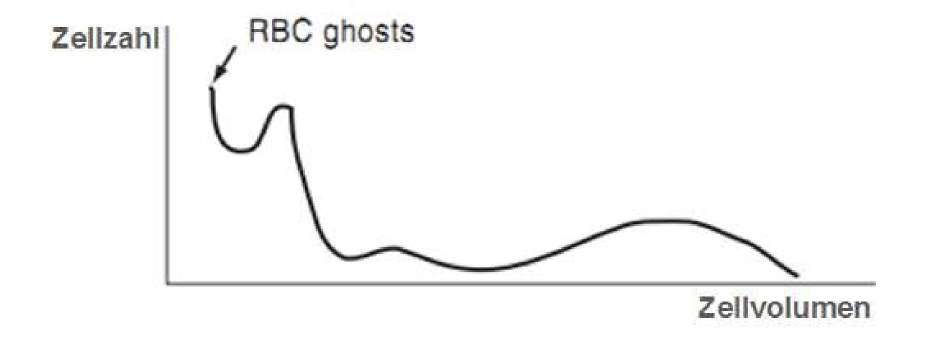


Abbildung 8: F1; Die Leukozytenverteilung kann aufgrund rückständiger Erythrozytenbestandteile nicht analysiert werden (nach Benutzerhandbuch)

F2: Lymphozyten können nicht analysiert werden

Die mangelhafte Bestimmung der Lymphozyten (Abbildung 9) entsteht überwiegend aufgrund einer geringen Anzahl an Lymphozyten, welche dann nicht von der Granulozytenpopulation abgegrenzt werden können (vgl. Abbildung 7).

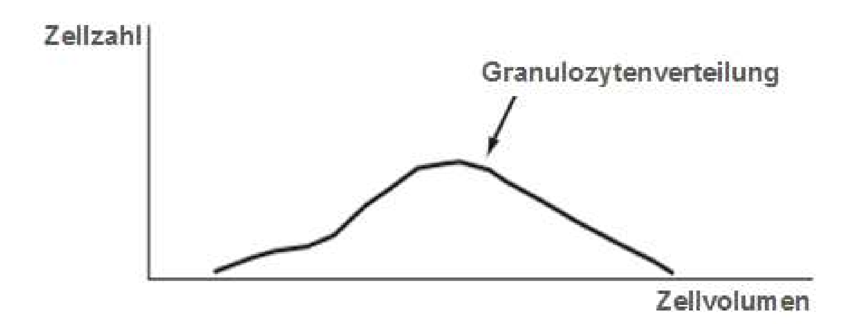


Abbildung 9: F2; Im Histogramm kann die Lymphozytenverteilung nicht von den Granulozyten abgegrenzt werden und somit nicht analysiert werden (nach Benutzerhandbuch)

F3: Granulozyten können nicht analysiert werden

Bei dieser Fehlermeldung ist die Erkennung einer Granulozytenpopulation nicht möglich (Abbildung 10). Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. So ist es möglich, dass der Zeitabstand zwischen Blutabnahme und -analyse mehr als acht Stunden betrug, die Blutprobe nicht sachgemäß gelagert wurde, die Granulozyten aufgrund schwacher Membranen zu früh lysiert wurden oder die falschen Reagenzien eingesetzt wurden. Es kann aber auch tatsächlich nur eine geringe Anzahl an Granulozyten vorhanden sein.



Abbildung 10: F3; Die Granulozytenpopulation kann nicht definiert werden (nach Benutzerhandbuch)

F4: Leukozyten können nicht differenziert werden

Im Falle einer generellen mangelhaften Differenzierung erscheint die Fehlermeldung F4, mit dem Hinweis, dass keine einzige Leukozytenpopulation differenziert und abgegrenzt werden kann (Abbildung 11). Zu den möglichen Ursachen hierfür zählen, dass Granulozyten aufgrund schwacher Membranen zu früh lysiert oder, dass Reagenzien falsch angewendet wurden.

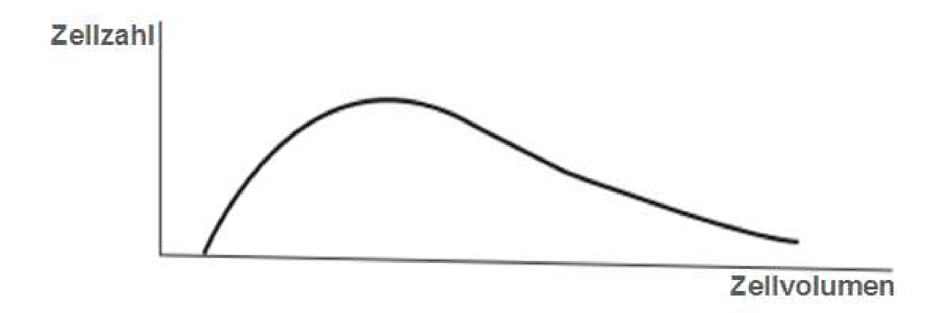


Abbildung 11: F4; Die Leukozytenzellpopulationen können nicht differenziert werden (nach Benutzerhandbuch)

In der aktuellen Software existieren bei diesem Gerät keine spezifischen Fehlermeldungen für die unklare Trennung zwischen der PLT- und RBC-Volumenverteilungen. Wird ein „!“ neben den Ergebnissen der Leukozytenanzahl angezeigt, so sind ebenfalls Erythrozytenrückstände vorhanden, wodurch die Leukozytenanzahl verfälscht und die Messung nicht belastbar ist (Abbildung 12).

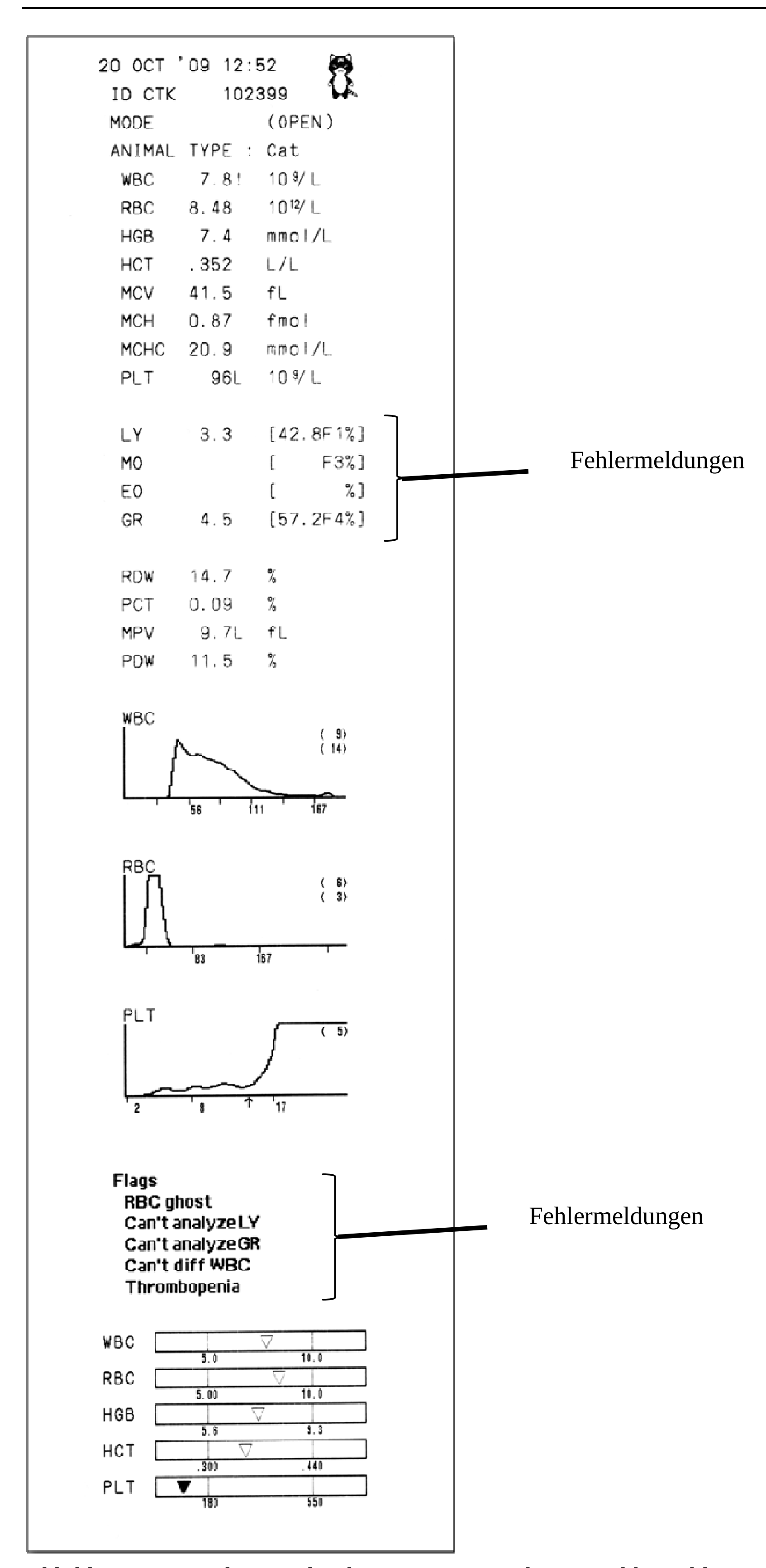


Abbildung 12: Ergebnisausdruck einer Katzenprobe mit Fehlermeldungen F1, F3, F4 und Thrombozytopenie

2.5. Hämoglobin-Bestimmung

Die Hämoglobinkonzentration (HGB) wird durch Spektrophotometrie bestimmt und wird gemessen an der optischen Dichte, die proportional zur Hämoglobinkonzentration ist. Der Messvorgang läuft in einem sogenannten Messbad (measurement bath) und frei von Zyanid ab. Um das Hämoglobin der Erythrozyten freizusetzen, wird die Blutprobe mit einem Hämolyse-induzierenden Mittel (HEMOLYNAC 3N, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) versetz. Die verdünnte Blutprobe, wird von einer LED (light-emitting diode, Leuchtdiode) durchleuchtet. Das auf eine Photodiode treffende Licht, welches nicht durch die Blutprobe absorbiert wird, wird durch diesen Rezeptor in ein elektrisches Signal übersetzt. Dieses wird amplifiziert, konvertiert und vom Hauptprozessor in Verhältnis zu den Absorptionswerten der unverdünnten Probe und dem reinen Verdünnungsmittel gestellt. Nach einer weiteren logarithmischen Konversion sowie Multiplikation durch einen Kalibrationskoeffizienten, werden die Ergebnisse am Bildschirm dargestellt.

2.6. Qualitätssicherung

Um die Richtigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten, werden Qualitätskontrollen durchgeführt. Das System der Qualitätssicherung beinhaltet: $\bar{x}$ (X bar)- R, L&J, $\bar{x}$ BATCH und $\bar{x}$ Day CV. $\bar{x}$ stellt den Mittelwert einer Datenreihe dar. Auf die einzelnen Programme wird im Folgenden eingegangen.

2.6.1. $\bar{x}$– R Programm

Das $\bar{x}$-R Programm berechnet die täglichen Werte von $\bar{x}$ (die Mittelwerte der ersten und zweiten Zählung derselben Kontrolle), sowie R, (Differenz der Werte der ersten und zweiten Zählung derselben Kontrolle). Das $\bar{x}$-R Programm berechnet auch $\bar{\bar{X}}$ und $\bar{R}$, welche die Mittelwerte für $\bar{x}$ und R über mehrere Tage hinweg darstellen (Abbildung 13). Die Kontrolle wird mindestens zweimal täglich gemessen über mehrere (k) Tage.

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\sum \bar{X}}{k} \qquad \bar{R} = \frac{\sum R}{k}$$

$\bar{X}$ = Mittelwert für einen Tag $\bar{\bar{X}}$ = Mittelwert für mehrere (k) Tage

R = Differenz eines Tages $\bar{R}$ = Differenz über k Tage

Abbildung 13: Berechnungen des $\bar{\bar{x}}$-R Programms

Der Hersteller empfiehlt als Kontrollmaterial ausschließlich das firmeneigene MEK-3D (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) zu verwenden, um die Zuverlässigkeit der Daten des $\bar{\bar{x}}$-R Programms zu sichern. Die oberen und unteren Limits werden mit der Drei-Sigma-Regel statistisch berechnet, können aber auch manuell angepasst werden.

Die Ergebnisse werden in graphischer Form mit oberen und unteren Grenzwerten dargestellt, so dass ein Referenzbereich entsteht. Es gibt mehrere, typische Fehlerquellen die dazu führen, dass Datenpunkte außerhalb des Referenzbereiches von $\bar{\bar{x}}$ liegen können. Dazu gehören veraltete Verbrauchsmaterialien des Gerätes und Unterschiede in der Zusammensetzung der Kontrollmaterialien aufgrund unterschiedlicher Chargen oder Gerätefehler. Bei abweichenden Datenpunkten der R-Analyse sind die zugrundeliegenden Fehlerquellen häufig ein unzureichendes Mischen der Kontrolle, Temperaturschwankungen des Verdünnungsmittels oder Verschmutzungen innerhalb des Gerätes. Aber auch Gerätefehler, wie ein Fehler im Verdünnungsverhältnis („dilution ratio error“) oder im Stromkreis („circuit error“) können eine Rolle spielen.

2.6.2. L&J Programm

Das L&J (Levey und Jennings) Programm analysiert täglich eine Kontrolle, wovon der Mittelwert sowie die Standartabweichung automatisch berechnet werden. Die Datenpunkte werden graphisch als L-J Diagramm dargestellt (Abbildung 14).

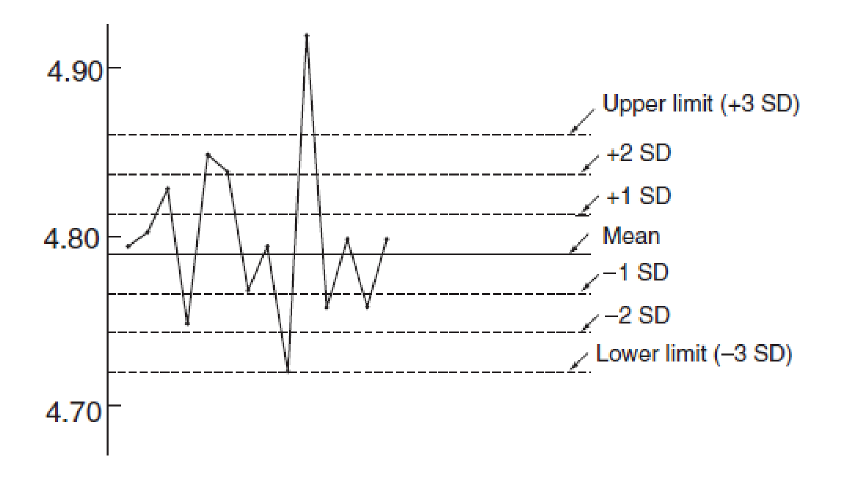


Abbildung 14: L&J Diagramm (Benutzerhandbuch)

Die Westgard® Regeln, welche spezifische Grenzwerte für die Leistung einer Methode definieren, werden durch die Programmierung in dieser Qualitätskontrollmaßnahme berücksichtigt (Westgard et al. 1977). Die unteren und oberen Limits werden berechnet. Wenn ein Datenpunkt außerhalb des Referenzbereiches liegt, wird eine entsprechende Meldung („out of range“) angezeigt. Die Fehlerquellen sind analog zu den in Abschnitt 2.6.1 „$\bar{X}$-R“ aufgeführten.

Es wird vom Hersteller empfohlen, ausschließlich die drei firmeneigenen Kontrollmaterialien zu verwenden: MEK-3DN (Normal), MEK-3DH (High/Hoch) und MEK-3DL (Low/Niedrig) (Nihon Kohden, Tokyo, Japan).

2.6.3. $\bar{x}$-BATCH Programm

Das $\bar{x}$ BATCH ($\bar{x}$B) Programm teilt die täglichen Messungen in Gruppen von 20 Messungen ein. Der Mittelwert der jeweiligen Messungen von MCV, MCH und MCHC in einer Gruppe wird berechnet (Abbildung 15). Der Durchschnitt der $\bar{X}$B Messungen ermöglicht eine Übersicht der Präzision des Systems, da physiologische Variationen in diesen Parametern (MCV, MCH und MCHC) minimal sind. Somit werden die $\bar{x}$B Werte minimal durch die Unterschiede zwischen den Blutproben beeinflusst und der Grad der Präzision kann uneingeschränkt widergespiegelt werden.

$$X(B,i) = X(B,i-1) + SGN[F] \times (F/N)^2$$

$$F = \sum SGN[X_j - X(B,i-1)] \times \sqrt{|X_j - X(B,i-1)|}$$

$X(B,i) = \bar{X}B$ of present batch *X_j = each data in batch*

$X(B,i-1) = \bar{X}B$ of previous batch *SGN [ ]= sign function*

N= number of samples in batch

Abbildung 15: $\bar{x}$B zugrunde liegenden Berechnungen

Die $\bar{X}$ B Werte der vorangegangenen 20 Messungen (previous batch) sind erforderlich um die $\bar{X}$B Werte der gegenwärtigen 20 Messungen (present batch) zu berechnen.

2.6.4. $\bar{x}$Day CV

Das $\bar{x}$ D • CV ($\bar{x}$ Day Coefficient of Variation) Programm berechnet den täglichen Durchschnittswert der an dem jeweiligen Tag gemessenen Proben, den Variationskoeffizient hiervon, sowie die Standardabweichung (Abbildung 16). Es werden nur Proben einbezogen, deren Messwerte im physiologischen Bereich oder im programmierten Normalbereich liegen.

$\overline{X}$D: $\overline{X}$B Daily mean value of daily sample data

CV: Coefficient of Variation (Variationskoeffizient, %) $= \frac{Standard\ deviation}{\overline{X}D} x\ 100\ (\%)$

SD= Standard deviation (Standardabweichung) $= \sqrt{\frac{\sum(\overline{X}-X)^2}{N-1}}$

$\overline{X}$= Mittelwert

X= gemessener Wert

N= Häufigkeit der Messungen

Abbildung 16: Dem $\bar{x}$ D • CV zugrundeliegenden Berechnungen

2.7. Evaluierung

Geräte der Celltac-Linie wurden bereits mehrmals in der Humanmedizin evaluiert. In diesen Evaluierungen ist der Korrelationskoeffizient (r) der Indikator für den Grad der Übereinstimmung zwischen Celltac und Vergleichsmethoden. Eine Korrelation von r ≥ 0,5 wurde als eine gute Korrelation und ≥ 0,7 als sehr gute Korrelation bewertet. Die Korrelation kann durch verschiedene Variablen beeinflusst werden, die nicht unbedingt etwas mit der eigentlichen Übereinstimmung zu tun haben. So steigt beispielsweise der r-Wert auch bei einer hohen Spannweite der Messergebnisse, ohne dass es auf eine eigentliche Übereinstimmung der Messergebnisse zurückzuführen wäre. Ebenso eignet sich die alleinige Analyse durch Regressionsanalysen beim Vergleich von Messmethoden nicht. Es sollte stattdessen ein kombinierter Ansatz, wie er durch die Bland-Altman-Analyse geboten wird, angewendet werden (Grouven et al. 2007).

Von Nagai et al. wurde gezeigt, dass der Celltac F (MEK 8222) bei der Thrombozytenmessung von Humanblutproben eine sehr gute Korrelation zur ICSH/ISLH Referenzmethode (r = 0,99) und zur manuellen Methode (r = 0,93) aufweist (Nagai et al. 2005).

In der Humanmedizin zeigte der Vergleich vom Celltac F zum Sysmex XE-2100 eine gute Korrelation für die meisten CBC- und Differentialparameter. Eine sehr

gute Korrelation wurde für WBC, RBC, Hämoglobin, Hämatokrit und PLT ($r \geq 0,98$) und die weiteren Erythrozytenparameter ($r \geq 0,93$) im Vergleich mit dem XE-2100 erreicht (Longair et al. 2011). Die klinische Evaluierung mit Referenz zum Cell-Dyn 4000 erfolgte ebenfalls, wobei auch Lagerungseffekte der Blutproben berücksichtigt wurden. Hierbei war die Korrelation für CBC sowie Leukozytendifferenzierung gut, abgesehen von den Messwerten der Basophilen. Auch der Vergleich zur manuellen Methode ergab eine sehr gute Korrelation für Neutrophile ($r = 0,956$), Lymphozyten($r = 0,951$) und Eosinophile ($r = 0,834$) (Kondo et al. 2004, Kondo et al. 2005). Der Vergleich zum Sysmex SF-3000 bewies gute Korrelation bei der automatischen Zählung der unreifen Granulozyten, sowie bei der Analyse der üblich erhobenen Blutbildparameter. Für die Leukozytenparameter wurde, im Vergleich zum SF-3000 eine sehr gute Korrelation für: Neutrophile ($r = 0,971$), Lymphozyten ($r = 0,967$), und Eosinophile ($r = 0,960$) gezeigt. Bei Monozyten wurde positive Korrelation ($r = 0,76$) der beiden Methoden beschrieben.

3. Sysmex XT2000iV

Der Sysmex XT2000iV ist ein an die Ansprüche der Veterinärmedizin angepasstes Model des in der Humanmedizin eingesetzten Sysmex XT2000i. Es stehen folgende Kanäle der Messung zur Verfügung:

- RBC/PLT- Kanal
- Hämoglobin-Kanal
- WBC-Kanal (Bestimmung im Modus »CBC«)
- DIFF-Kanal.

3.1. RBC/PLT-Kanal

Erythrozyten und Thrombozyten werden im RBC/PLT-Kanal in einer gemeinsamen Messkammer analysiert und gemessen. Der bei menschlichem Blut sowie Hundeblut physiologisch vorhandene Größenunterschied zwischen Thrombozyten und Erythrozyten ermöglicht hier eine eindeutige Trennung. Katzenblut stellt eine größere Herausforderung dar, da Thrombozyten zu Polymorphologie und Aggregation neigen (Mischke 2003).

Für das Messverfahren mittels hydrodynamischer Fokussierung und Impedanz werden 4µl Blut der Probe verwendet (entspricht einem Fünftel des Gesamtprobenvolumens) und mit CELLPACK (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) im Verhältnis 1:501 in der Mischkammer verdünnt. Im weiteren Verlauf werden 10,3µl in die Messkammer gefüllt und durch eine Kapillare, welche als Messöffnung dient, hindurchgesogen. Wenn die Zellen einzeln durch die Messöffnung treten, wird ein elektrischer Widerstand nach dem Impedanz-Prinzip erzeugt (s. Abschnitt 1.1). Dieser Widerstand ist proportional zur Zellgröße. Das Ergebnis wird als Histogramm graphisch dargestellt.

Der Hämatokritwert wird anhand der kumulativen Impulshöhensummierung ebenfalls in diesem Kanal ermittelt. MVC, MCH und MCHC werden aus diesem Wert berechnet.

3.2. Hämoglobin-Kanal

Im Hämoglobin-Kanal wird die SLS-Hämoglobinmethode angewendet. Die Besonderheit dieser Methode ist, dass dafür kein Zyanid erforderlich ist. Stattdessen wird das Reagenz SULFOLYSER (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), das Natriumlaurylsulfat (Sodium-Lauryl-Sulfate, SLS) enthält, verwendet. SLS verfügt über einen seifenartigen Charakter und ermöglicht die Messung von fettreichen Blutproben weil SLS die Trübung, die durch den hohen Fettgehalt verursacht wird, weitestgehend bereinigt.

Die für die RBC/PLT Messung hergestellte Verdünnung wird zusätzlich mit SULFOLYSER vermischt, so dass eine Verdünnung von 1:751 entsteht.

SLS löst Lipoproteine in den Zellmembranen der Erythrozyten. Dadurch wird Hämoglobin freigesetzt. SLS bindet nun an den Globin-Anteil und führt zu einer Konformationsänderung im Hämoglobinmolekül, wodurch die Oxidation des zwei-zum dreiwertigen Eisen möglich wird. So entsteht aus Hämoglobin Methämoglobin. Die hydrophoben Teile des SLS binden an den Globin-Anteil, während die hydrophilen Teile nun an das jetzt dreiwertige Eisen binden können. Dadurch entsteht der stabile Farbkomplex SLS-HB, der bei einem Absorptionsmaximum von 555nm gemessen werden kann.

Die Zyanid-Messmethode ist die vom ICSH empfohlene Standardmethode (s. Abschnitt 1.6.). Allerdings ist die SLS-Hämoglobinmethode seit circa 20 Jahren etabliert und es ist nachgewiesen worden, dass die Messungen mithilfe der

Zyanid-Methode gut mit denen der SLS-Methode übereinstimmen (Lewis et al. 1991, Zwart et al. 1996).

3.3. WBC-Zählung

Die Zählung der Leukozyten und Basophilen findet in WBC/BASO-Kanal im CBC-Modus (Complete Blood Count, kleines Blutbild) mithilfe der Durchflusszytometrie statt.

Das Blut wird mit Stromatolyser-FB (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) im Verhältnis von 1:50 verdünnt. Dadurch soll eine komplette Lyse der Erythrozyten erreicht werden. Das saure Reagenz bewirkt zudem ein Schrumpfen der Leukozyten, lediglich die Basophilen werden dabei stabilisiert. Größe und Struktur der Zellen bleiben, zumindest bei menschlichen Proben, erhalten.

Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden gemessen. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht innere Struktur und die Komplexität der inneren Beschaffenheit, also die Granularität, der Zelle widerspiegeln.

Die Detektion von Basophilen ist derzeit nicht zuverlässig bei Proben von Hunden und Katzen (Lilliehöök and Tvedten 2011). Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Lyseresistenz der Basophilen von Menschen im Vergleich zu denen von Hunden und Katzen. Menschliche Basophile sind stabiler und damit zu einem höheren Grad lyseresistent als Basophile von Hunden und Katzen. Somit kann diese Methode nicht ohne weitere Anpassungen für die Erfassung von Basophilen in die Anwendung in der Veterinärmedizin übernommen werden.

3.4. WBC-Zählung und -Differenzierung

Im CBC + DIFF Modus werden mithilfe von Fluoreszenz-Durchflusszytometrie die vier Zellpopulationen der Leukozyten bestimmt: Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten und Monozyten.

Die Blutprobe wird mit der Reagenzmischung, bestehend aus Fluoreszenzfarbstoff und Lysereagenz, im Verhältnis von 1:51 verdünnt. Das Lysereagenz, Stromatolyser- 4DL (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), bewirkt eine Lyse der Erythrozyten und die Perforation der Zellmembranen der Leukozyten.

Stromatolyser-4DS ist ein Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff, der in die Leukozyten eindringt, und die Nukleinsäuren im Nukleus und Zytoplasma färbt. Durch das Anfärben der RNS und DNS kann die Zellaktivität und der Reifegrad der Zellen beurteilt werden. Die Probe wird mit einem Halbleiterlaser mittels Durchflusszytometrie analysiert, indem die Fluoreszenzintensität und das Seitwärtsstreulicht der Zellen gemessen werden.

Die gemessene Fluoreszenz gibt Auskunft über den Gehalt der in der Zelle vorhandenen RNS/DNS, während das Seitwärtsstreulichtintensität von der inneren Beschaffenheit der Zelle (Granularität, Größe und Lobularität des Kerns) abhängt. Besonders eosinophile Granulozyten können dadurch gut von den anderen Zellenpopulationen abgegrenzt und dargestellt werden.

3.5. Erfassung von Retikulozyten

Im RET-Kanal (Retikulozyten, reticulocytes) werden Retikulozyten mithilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie erfasst. Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität werden analysiert.

Die Blutprobe wird mit einem spezifischen Reagenzgemisch (Retsearch II, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) inkubiert. Die Membranen aller Blutzellen werden perforiert, so dass der Fluoreszenzfarbstoff in die Zelle eindringen und an Nukleinsäuren im Zellkern und Zytoplasma binden kann. Zellarten können aufgrund ihres Gehalts an Nukleinsäuren klar voneinander getrennt werden, da der Nukleinsäuregehalt in der Zelle mit zunehmender Reifung der Retikulozyten kontinuierlich abnimmt. Anhand der Fluoreszenz unterscheidet das Gerät drei Retikulozytenpopulationen: reife Retikulozyten (Low-Fluorescence Reticulocyte, LRF), halbreife Retikulozyten (Medium-Fluorescence Reticulocyte, MFR) und unreife Retikulozyten (High-Fluorescence Reticulocyte, HFR).

Informationen zur Retikulozytenpopulation ermöglichen die diagnostische Differenzierung zwischen einer regenerativen und aregenerativen Anämie.

3.6. Evaluierung

Die Evaluierung des Sysmex XT2000i im humanmedizinischen Umfeld erfolgte bereits in mehreren Studien unter Berücksichtigung der diversesten Parameter (Fernandes and Hamaguchi 2003, Fujimoto et al. 2000, Hill et al. 2009, Langford et al. 2003, Ogawa et al. 2010, Ratomski et al. 2010). Leers et al analysierten

n = 418 Proben in einem Vergleich des Cell-Dyn Rubys und des Sysmex XT2000i. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Aufwand für die Nacharbeitung nicht auswertbarer Proben zu definieren. Die Geräte erbrachten bei der Analyse der gängigen CBC-Parameter ähnliche Ergebnisse. So ergab die Analyse der Gesamtleukozytenzahlen ein Bias von 0,0 und die des Differentialblutbilds ein Bias von -0,08 bis 0,06 (Monozyten und Neutrophile respektive). Der Sysmex konnte bei 3,1% der Proben kein Differenzialblutbild liefern, oder hielt die Ergebnisse der Messungen zurück, während der Cell-Dyn Ruby ein Differenzialblutbild für alle Proben lieferte. Der Sysmex musste dementsprechend häufiger eine zweite Analyse einer Probe anfertigen als der Cell-Dyn Ruby (21% vs. 4,3%) (Leers et al. 2011). Durch unvollständige oder nicht zuverlässige Ergebnisse, ist die weitere Bearbeitung durch Personal erforderlich und es entsteht zusätzlicher Arbeitsaufwand.

Die Zuverlässigkeit des Sysmex XT2000i wurde von Langford et al. anhand von Proben von adulten und juvenilen Patienten (n = 114) am etablierten Vorgängermodell, dem XE-2100, gemessen. Für den Sysmex XT2000i konnte eine exzellente Übereinstimmung der Messwerte für alle analysierten Parameter ($r^2 > 0,92$) im Vergleich zu denen des XE-2100 nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete MCHC, wo eine geringere, aber dennoch als positiv einzustufende Übereinstimmung ($r^2 > 0,8552$) gezeigt werden konnte (Langford et al. 2003). Fernandes und Hamaguchi haben ähnliche Ergebnisse erzielt und bestätigten, dass bei allen gemessenen Parametern die Herstellerangaben übertroffen wurden (Fernandes and Hamaguchi 2003).

Für die Adaption des Gerätes an veterinärmedizinische Anforderungen liegen ebenfalls zahlreiche Studien zur Evaluierung vor. In diesen Studien wurde der Sysmex allgemein als robust und zuverlässig bewertet, wobei die ersten Untersuchungen anhand Proben gesunder Versuchstiere durchgeführt wurden (Toyota 2004). Lilliehöök und Tvedten validierten den Sysmex XT2000iV ausführlich im klinischen Umfeld und verwendeten dementsprechend Proben von klinisch kranken Tieren (133 Hunde, 65 Katzen und 73 Pferde). Die Zählung der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten lieferte im Vergleich zum Cell-Dyn 3500 sehr gute Ergebnisse und zeigte eine hohe Übereinstimmung ($r \geq 0,98$). Die Messungen von Hämatokrit und des mittleren Erythrozytenvolumens wiesen einen systematischen Unterschied bei Katzen- und

Pferdeproben auf. Die Messungen der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (mean corpuscular/ cellular hemoglobin concentration, MCHC) stimmten bei allen Tierarten wenig mit den Ergebnissen den Cell-Dyns überein (r = 0,33 - 0,67). Zum Zeitpunkt dieser Studie wurde der XT2000iV noch mit menschlichen, standardisierten Proben kalibriert, was eine mögliche Erklärung für diese Abweichung darstellt. Seit der Softwareversion 9.0 ist jedoch die individuelle Kalibration mit Proben der einzelnen Tierarten möglich, das könnte dazu beitragen, diese Messfehler zu beheben (Lilliehook and Tvedten 2009a).

Die Zählungen der Retikulozyten bei Proben von Hunden korrespondierten mit den manuellen Zählungen ($r \geq 0,90$). Bei Katzenproben stimmten die Messungen von aggregierten Retikulozyten größtenteils überein (r = 0,86), während die Übereinstimmung bei der Messung der punktierten Retikulozyten nicht zufriedenstellend war (r = 0,50) (Lilliehook and Tvedten 2009a).

Das vierteilige Differenzialblutbild wurde mit manuellen Auswertungen und Ergebnissen des Cell-Dyns 3500 verglichen. Die Differenzierung der Leukozyten stimmte größtenteils mit den Vergleichsmethoden überein. Die Messwerte für die Neutrophilen und Lymphozyten zeigten bei allen drei getesteten Tierarten eine hohe Übereinstimmung zwischen den Methoden (Neutrophile $r \geq 0,97$; Lymphozyten $r \geq 0,87$). Die gemessenen Gesamtzahlen der Leukozyten waren beim Sysmex 10 - 26% höher als beim Cell-Dyn und der manuellen Bestimmung. Eosinophile wurden im Streuungsdiagramm (Scattergram) als eigenständige Gruppe gegenüber den anderen Leukozyten gut differenzierbar dargestellt. Auch der gezeigte Wert von $r \geq 0,93$ spricht für eine hohe Übereinstimmung. Einzig bei der Tierart Pferd gab es eine geringere Korrespondenz zur manuellen Messung (r = 0,72). Basophile Granulozyten wurden bei sieben Hunden und fünf Katzen, die laut manueller Bestimmung eine Basophilie aufwiesen durch den Sysmex nicht erkannt. Unvollständige Ergebnisse wurden bei 18% der Katzenproben, 13% der Hundeproben und 3% der Pferdeproben geliefert. Viele dieser Proben wiesen allerdings starke Linksverschiebungen und toxische Veränderungen auf (Lilliehook and Tvedten 2009b).

In einer Studie zum Vergleich des Sysmex XT2000iV, Advia 120 (Siemens Healthcare Diagnostics AB, Tarrytown, NY, USA) und des Cell-Dyns 3500, wurde gezeigt, dass keines dieser Geräte basophile Granulozyten zuverlässig

erkennen konnte. Dabei wurden 17 Proben von Hunden, Katzen und Kaninchen mit manuell diagnostizierter Basophilie mithilfe dieser drei Geräte analysiert. Keines der getesteten Geräte konnte basophile Granulozyten von Hunden erkennen. Auch in den Streuungsdiagrammen war kein Hinweis auf eine Basophilie zu beobachten. Lediglich bei einer Probe mit 54% basophilen Granulozyten gab der Sysmex die Meldung „WBC Abn Scattergram“ aus, womit auf eine abnormale Verteilung der Granulozyten im Streuungsdiagramm hingewiesen wird (Lilliehöök and Tvedten 2011).

Mathers et al. evaluierten den Sysmex im Vergleich zum Advia 120 und kamen zu einem guten Ergebnis. Alle überprüften Parameter stimmten bei beiden Geräten nahezu überein ($R^2 \geq 0{,}986$)(Mathers et al. 2008).

Auch bei der Analyse von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von Ratten und Mäusen korrespondierten die vom Sysmex gelieferten Ergebnissen mit denen des Sysmex XT2000i (humanmedizinische Ausführung) und des Advia 120. Somit kann das Gerät auch zur Analyse nicht-hämatologischer Proben eingesetzt werden (Mathers et al. 2007).

Die veterinärmedizinische Ausführung des Geräts, der Sysmex XT2000iV, ist mittlerweile durch die genannten Studien als Referenzmethode etabliert und wurde seither in zahlreichen Studien als Referenzemethode verwendet (Bourgès-Abella et al. 2011, Pankraz et al. 2009, Tvedten 2010, Tvedten et al. 2008, Tvedten and Lilliehöök 2011, Wassmuth et al. 2011).

4. Evaluierung von Messgeräten

Die Evaluierung von Messgeräten (Methodenvalidierung) stellt einen essentiellen Teil der Qualitätssicherung in klinischen Laboratorien dar. Nachdem die Kalibrierung neuer Analysegeräte mit Proben gesunder Tiere erfolgt, muss sichergestellt werden, dass auch die Messung von Blutproben von Patienten zuverlässige Ergebnisse liefert. Zu den Aufgaben eines Labors gehört es, Fehler zu minimieren, um die korrekte Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen und dadurch die Versorgung der Patienten sicherzustellen. Fehler können entweder durch die Abläufe der Analyse selbst oder durch den Anwender entstehen. Um alle möglichen Fehlerquellen und Variablen in der Analyse von Blutproben abzudecken, wird empfohlen die folgenden Aspekte zu beachten und sicherzustellen (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006):

- Verwendung validierter Methoden
- Durchführung interner und externer Qualitätskontrollen
- Sicherstellen der Fachkenntnisse des Anwenders bezüglich der Methoden und potentieller Fehlerquellen
- Kalibrierung und Wartung der Gerätschaften
- Standardvorgehensweise (Standard Operating Procedure (SOP)) als Bestandteil hauseigener Protokolle

4.1. Fehler

Falsche Testergebnisse können, je nach Zeitpunkt relativ zur Messung, in drei Kategorien unterteilt werden: präanalytische Fehler, Gesamtfehler und postanalytische Fehler (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Die Validierung von Analysegeräten im klinischen Umfeld soll Aufschluss über den Gesamtfehler geben. Unter präanalytische Fehler fallen beispielsweise unsachgemäße Blutabnahmetechnik oder falsche Lagerung der Proben. Ein klassischer postanalytischer Fehler besteht in der inkorrekten Ablesung der Ergebnisse. Gesamtfehler können unterschieden werden in systematische und zufällige Fehler (Abbildung 17).

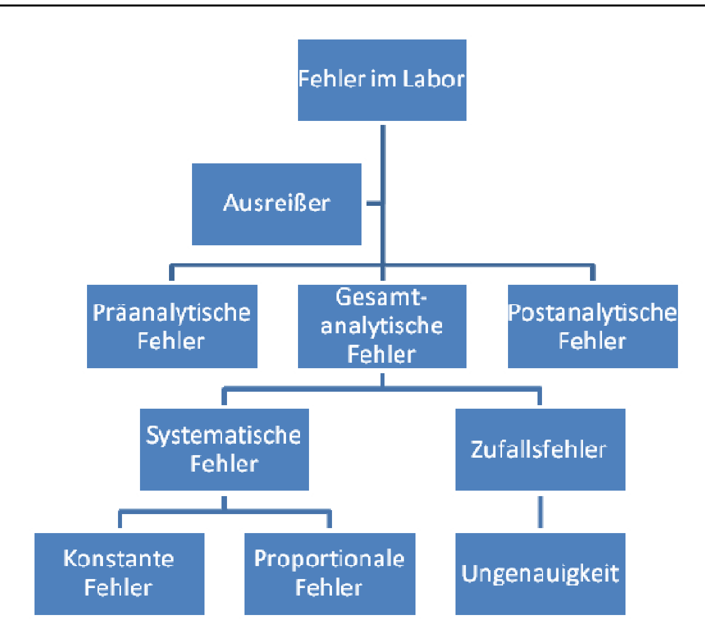


Abbildung 17: Fehlerkategorien (nach Jensen und Kjelgaard-Hansen 2006)

Der Gesamtanalytische-Fehler (total analytical error) oder Gesamtfehler ist eine quantitative Messgröße (Inczédy et al. 1998). Das Gegenstück dazu im Rahmen qualitativer Untersuchungen wird als Richtigkeit oder Messsicherheit bezeichnet.

Der Zufallsfehler (random error) ist ein qualitativer Wert, der die Präzision einer Messmethode beschreibt. Er steht aber nicht im Zusammenhang mit dem wahren Wert (Westgard 1995, 1998). Der Variationskoeffizient (coefficient of variation, CV) stellt das Maß an Präzision dar und hängt von der Konzentration des gemessenen Parameters ab. Der Variationskoeffizient ist der Quotient der Standardabweichung (standard deviation, SD) und des Mittelwerts.

Systematische Fehler oder Messabweichungen (systematic error), beeinflussen die Richtigkeit und werden als Bias erfasst. Mechanische Fehler, falsche Einstellungen der Software oder Verunreinigungen innerhalb des Analysegerätes können hierfür beispielsweise eine Ursache darstellen.

Die Beurteilung der Präzision eines Gerätes erfolgt durch wiederholte Messungen mit identischem Material. Dieses ist bei der Kalibration von Geräten standardisiertes Kontrollmaterial, während in der Validierungsphase mit derselben Blutprobe mehrere Messungen durchgeführt werden.

Zur Beurteilung der Richtigkeit werden in der Validierungsphase zwei

Vorgehensweisen empfohlen. Im Rahmen genereller Qualitätskontrolle werden Kontrollmaterialien mit bekannten Messwerten täglich gemessen, um systematische Fehler weitestgehend ausschließen zu können. Wichtiger ist aber der Vergleich der Messergebnisse anhand Patientenproben des zu testenden mit denen eines bereits validierten Gerätes.

Eine weitere Methode zur Qualitätskontrolle bieten Ringversuche. Dabei wird ein Material durch am Ringversuch beteiligte Institute analysiert und die Ergebnisse daraufhin verglichen. Ringversuche sind in der Humanmedizin bereits etabliert.

4.2. Methodenvalidierung

Die Validierung von neuen Methoden und Evaluation im klinischen Umfeld wurde bereits häufig in Fachmedien diskutiert (Briggs et al. 2008, England et al. 1994, Flatland et al. 2010, Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006, Klee 1990, Tonks 1963, Westgard 1995, 1998, 2003, Westgard et al. 1974, Westgard and Hunt 1973, Westgard et al. 1994). Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, Richtlinien und Empfehlungen zu diesem Thema. Das „International Council for Standardization in Hematology“ (ICSH) und das „National Committee on Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS), das inzwischen „Clinical Laboratory and Standards Institute“ (CLSI) genannt wird, haben mehrere Richtlinien und Empfehlungen zum Thema Methodenvalidierung und Messgenauigkeit veröffentlicht.

Dabei wird die Messgenauigkeit oder -richtigkeit als Übereinstimmung des gemessenen Wertes mit dem „wahren Wert“ definiert (ICSH, 1994). Der „wahre Wert“ wiederum muss ebenfalls anhand etablierter und vorgegebener Referenzmethoden ermittelt werden. Es existieren unter anderem Empfehlungen zur Hämoglobinmessung (ICSH 1987; NCCLS 1994), der Thrombozyten- (ICSH 1988b) und Retikulozytenzählung (ICSH 1992, NCCLS 1993), zur Bestimmung des Mikrohämatokrits (ICSH 1989), der Erythrozyten- (ICSH 1988), und Leukozytenanzahl (ICSH 1988), und zur Erstellung des Differenzialblutbilds (NCCSL H20-A).

Auch einzelne Autoren oder Verbände haben Empfehlungen verfasst. So hat beispielsweise die „American Society for Veterinary Clinical Pathology“ (ASVCP) 1996 das „Quality Assurance and Laboratory Standards Committee “ (QAS) gegründet. Empfehlungen des QAS Committees werden in drei Kategorien unterteilt: generelle analytische Fehler in der Leistung von veterinärmedizinischen

Laboreinrichtungen und darauf bezogene Vergleiche, Hämatologie und Hämostase, und klinische Chemie, endokrine Funktionsprüfung und Urinanalyse.

Die Empfehlungen wurden aufgrund mangelnder Kontrolle durch die Regierung herausgegeben (Flatland et al. 2010) und skizzieren schrittweise die Prinzipien der Qualitätssicherung und Sicherstellung von Qualitätsstandards. Parameter der Qualitätskontrolle (Quality Control, QC) im Rahmen der Selbstkontrolle beinhalten unter anderem die Festlegung von Kriterien zur Sicherstellung eines akzeptablen Leistungsbereiches von QC-Materialien, Häufigkeit der Überprüfung des Kontrollmaterials (beispielsweise nach dem Wechsel einer Charge eines Reagenz), Überprüfung kumulierter QC-Ergebnissen und das Befolgen von Herstelleranweisungen zur Routine-Wartung von Gerätschaften (Flatland et al. 2013, ASVCP 2009).

Eine interne Qualitätskontrolle kann mithilfe von kommerziell erhältlichem Kontrollmaterial durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Messungen sollten dokumentiert werden. Durch Qualitätssicherungsmethoden wie Levey-Jennings-Diagrammen wird die Verlaufskontrolle ermöglicht.

Jensen und Kjelgaard-Hansen haben ein umfassendes Protokoll für Methodenvalidierung erstellt (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006). Nach Jensen und Kjeelgard-Hansen, gliedert sich die Validierung neuer Tests in drei Aspekte (Jensen AL 2010).

- Analytisches Verhalten (Analytical Performance)
- Überschneidungsverhalten (Overlap Performance)
- Klinisches Verhalten (Clinical Performance)

In der ersten Phase, die besonders für Analysegeräte relevant ist, werden unter anderem die Präzision, Messsicherheit und der Methodenvergleich behandelt.

Um darzustellen, wie präzise oder unpräzise Messungen sind, werden Analysen innerhalb einer Messwertreihe (within run) und zwischen Messwertreihen (between run) durchgeführt. Bei diesen Analysen werden mehrere Messungen an einer Probe oder Probengruppe entweder nacheinander oder in definierten Zeitabständen z.B. zwei Mal täglich über fünf Tage hinweg durchgeführt. Das Ergebnis der Präzision wird als Variationskoeffizient in Prozent dargestellt (coefficient of variation, CV).

Der Variationskoeffizient sollte 5% oder ein Achtel des Referenzintervalls (Prozent vom Mittelwert der Spannweite) für automatisierte Analysen nicht überschreiten (Tonks 1963).

Die Richtigkeit oder Messsicherheit stellt die Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert einer Anzahl von Messungen der gleichen Probe und des wahren Wertes dar. Die Messunsicherheit wird auch als Bias oder systematischer Fehler bezeichnet. Systematische Fehler werden in konstante und proportionale systematische Fehler unterteilt.

Ein konstanter Fehler liegt vor, wenn beim Vergleich zweier Methoden eine Methode konsequent höhere oder niedrigere Werte misst im Vergleich zur zweiten Methode. Bei einem proportionalen systematischen Fehler ist die Abweichung zwischen den Messungen der beiden Methoden proportional zur Höhe der gemessenen Werte. Um die Art und Höhe des systematischen Fehlers zu ermitteln, wird ein Methodenvergleich durchgeführt (s. Abschnitt 4.1).

Bei der Validierung neuer Methoden, speziell beim Methodenvergleich, empfehlen Jensen und Kjelgaard-Hansen ein neun-stufiges Protokoll, in dem die Vorbereitung und Definition der Rahmenbedingungen einen besonderen Stellenwert einnehmen (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

III. PUBLIKATION

VALIDATION OF THE AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER CELLTAC ALPHA FOR CANINE AND FELINE BLOOD SAMPLES

Barbara Jane McDaniel [1], Johannes Hirschberger [1], Karin Weber [1]

[1]Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich, Germany

Corresponding Author:

Dr. Karin Weber, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

Phone: +49-89-21801672

FAX: +49-89-21806240

e-mail: karin.weber@lmu.de

Key words: cat, dog, hematology, packed cell volume, platelets, white blood cell

Running title: Validation of the Celltac alpha for dogs and cats

1. Abstract

Background: Small hematology analyzers for veterinary practices improve point-of-care diagnostics of companion animals. Validation of these instruments is needed to ensure accuracy of results.

Objectives: To validate the Celltac alpha by measuring feline and canine blood samples.

Methods: A total of 623 blood samples (363 canine, 260 feline) were analyzed on a Celltac alpha and a Sysmex XT-2000iV. Manual methods were applied for WBC differential count, PCV and feline platelet count. Flagging and precision of the new instrument were analyzed. Correlation and Bland-Altman analyses were used to compare the methods.

Results: Within-batch precision of the Celltac showed acceptable coefficients of variation for WBC (< 4%), PLT count (< 8%), HGB concentration (< 3%) and HCT (< 3%), while precision was poor for the leukocyte subpopulations. HGB and WBC count agreed well between the methods. CV for the GRAN count was 2-9% in cats and 6-29% in dogs. CV for the LYM count was 8-20% in cats and 13-51% in dogs. Negative bias and a proportional systematic error were apparent for PLT count (bias Sysmex – Celltac, canine -70.09 x 10^9/L; manual count – Celltac, feline -44.62 x 10^9/L), for feline HCT (bias manual PCV – Celltac -3.38%) and for eosinophil count. Analytical error flags and incomplete results were reported for 11.8 % of canine and 25.4% of feline samples.

Conclusions: The PLT count of the Celltac was precise but systematically overestimated. Feline HCT was systematically overestimated and WBC differential counts showed high imprecision.

2. Manuscript

Several small instruments for in-clinic use have been developed to facilitate point-of-care hematologic diagnostics in veterinary practice. Accuracy and reliability of different systems have been compared in several studies, often revealing important limitations of in-clinic analyzers compared to technically more advanced laboratory instruments[1-6]. The Celltac (Celltac alpha, MEK-6450, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) is a fully automated impedance point-of-care hematology analyzer which has initially been developed and tested for the analysis of human samples but is available with a software for veterinary samples since 2007[7, 8]. Its small footprint and low sample volume are advantageous in veterinary practice, but its performance has not yet been evaluated for animal patient samples. The instrument reports 20 variables using a sample volume of 30 µl. WBC count, RBC count, PLT count, hemoglobin (HGB) concentration, mean platelet volume (MPV) and a 4-part differential WBC count (lymphocytes, granulocytes, monocytes, eosinophils) and MCV are measured and the variables HCT, MCH, MCHC, RBC distribution width, plateletcrit and platelet distribution width are calculated. The granulocyte count of the Celltac does not differentiate between neutrophils and basophils. Flags for analytical errors are given in case of too high or too low WBC count, poor RBC lysis, PLT clumps or inability to measure granulocyte (GRAN), lymphocyte (LYM) eosinophil (EOS) and monocyte (MONO) or WBC differential. When WBC count is too high or too low for a measurement the instrument shows the option to automatically dilute the sample differently and re-measure it. Samples are flagged when out of the reference range for the variables WBC, RBC, HGB, RDW, MCV, MCHC and PLT.

In this study, we compared the results of the Celltac to a laboratory hematology analyzer (Sysmex XT 2000iV), which has been validated extensively for veterinary clinical use, and to manual reference methods using blood samples of canine and feline patients in order to assess its reliability and accuracy[9-12]. The frequency of flags and precision of the Celltac were assessed. The results of the most commonly used variables WBC, HGB, HCT, PLT, GRAN, LYM, EOS and MONO were compared between the different methods.

The aim of this study was to test the reliability of the Celltac to perform on-site

hematologic analysis of feline and canine blood samples for practitioners.

Performance criteria were set according to the suggestions made by Jensen and Kjelgaard-Hansen[13]. Blood samples were collected during diagnostic work-ups in the Clinic for Small Animal Medicine in Munich from 363 canine and 260 feline patients from November 2009 to March 2010. The number of samples was decided to be sufficient since the lowest range ratio (maximum value divided by the minimum value) was 5.75 (for feline hemoglobin)[14]. The samples were anticoagulated using EDTA-coated collection tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and automatically analyzed within two hours using the Celltac alpha (MEK-6450, Nihon Kohden, Tokyo, Japan, Software Version V01-01-01) and the Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan, Software Version 00-10). Control material was run daily on both instruments. For canine blood the impedance based PLT count was used in the Sysmex and the optical based PLT count was used for feline blood. The same reference values as used in-house for the Sysmex were programmed into both analyzers and were also used for manual methods. Two blood smears were prepared for manual WBC differentiation from all samples and stained with a modified Wright's stain (Hematek, Bayer, Germany). Three hundred cells were microscopically differentiated into five populations (neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, lymphocytes) by one observer (B. M.) on one or two slides, depending on WBC count. A manual platelet count was performed by one observer (B. M.) on feline blood samples. 20 µl EDTA-blood were collected in an end-to-end capillary and placed into a Thromboplus vial (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing a lysis reagent. After five minutes platelets were counted in a Neubauer counting chamber. Manual PCV was determined by microhematocrit centrifugation using heparinized hematocrit capillaries (Hirschmann, Laborgeräte, Ebersberg, Germany) and a Haematokrit 210 centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany).

The within-batch precision of the Celltac was tested on five canine and five feline samples. For each species three samples had normal and two samples had abnormal high WBC count. Ten replicate analyses were done on each sample within 20 minutes. The coefficient of variation (CV in %) was calculated for the variables WBC count, HCT, PLT count, HGB concentration, GRAN, LYM, EOS and MONO count as standard deviation (SD) / mean x 100. The between-batch precision was tested using stabilized human control blood material (level 1

'normal') provided by the manufacturer on 20 consecutive days.

Data were statistically analyzed with GraphPad Prism (GraphPad version 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Fisher's exact test was used to compare the proportions of flagged samples; The D'Agostino-Pearson test was used as normality test for the data. Spearman's correlation coefficient (r) was calculated to assess data range and Bland-Altman analysis for comparison of the Celltac to the Sysmex and manual methods was used to determine the source of bias.

The Celltac functioned well for the duration of this study. Operation and maintenance of the instrument was easy and only little time had to be spent for priming, rinsing and control measurements. Clogging due to clots in the samples could be easily removed, and the turnaround time was about one sample per minute.

The range of CV values and the data range for the precision study of canine and feline samples are shown in Table 1. In the pathologic samples with high WBC count the CV values were not consistently higher or lower for the different variables than in samples with normal WBC count. The within-batch precision for WBC count and HCT was within the range of maximum allowable imprecision for these variables as published in guidelines for the quality control of hematologic analyzers and was only slightly over the limits for HGB and PLT[15, 16]. However, for LYM and EOS, the within-batch CV values ranged much higher than published maximum allowable imprecision limits[17], especially in canine samples. For GRAN and MONO, no maximum imprecision limits are published, but the within-batch CV values range is considered too wide when compared to the values calculated when using the same samples on the Sysmex (GRAN CV 1.1- 2.9%; MONO 3.1-11.8%). For the judgment of acceptability as well as for the method comparison of the Celltac results it would be preferable to calculate the total allowable error for all variables[13].

In most studies, within-batch precision is reported to be better than between-batch precision. Surprisingly, in our study, between-batch precision was superior for most parameters to within-batch precision, probably because abnormal veterinary samples were included, while the human control sample consisted of stabilized material for the normal range. A linearity study was not done on our samples.

About 12% of canine samples and 25% of feline samples could not be analyzed completely due to error flags (Table 2). No values for PLT and HCT were released with the error flag 'RBC ghost' and for WBC differential with the error flag 'Can't diff WBC'. No apparent pathologic changes could be detected in most of these samples using other methods, so the reason for the analytical errors remains unclear. Similar problems with a high percentage of samples lacking WBC differential results have been reported in other impedance-based analyzers[5].

Similar to other studies, we performed a correlation analysis on the method comparison results. The correlation coefficients were all found to be < 0.99 and the median difference between the comparison methods was larger than 10% for several variables (Table 3). The correlation coefficient cannot be used to judge accuracy of the methods, since it does not assess agreement but association[17].

A comparable percentage of canine and feline samples were flagged for WBC, GRAN and HGB outside the reference range on both analyzers (Table 2), and Bland-Altmann analysis revealed biases close to zero for these variables in both species, although feline WBC count displayed much larger 95% limits of agreement than canine samples (Fig. 1 and 2).

A negative bias (i.e. overestimation) for PLT count in both, canine and feline samples was found, and in the corresponding Bland-Altman plots a proportional systematic error was apparent (Fig. 1). Feline platelets are difficult to differentiate in all impedance-based instruments, since they are large and show a tendency to form platelet aggregates, which are then counted in the RBC channel, resulting in underestimated respectively thrombocytopenia flagging of feline PLT by most analyzers[18, 19]. The Celltac, however, systematically overestimates PLT count in feline samples in the normal and high value range. Importantly, close inspection of the values revealed that the Celltac underestimates PLT count in the low range, i.e. a range from 90- 260 10^9/l by manual PLT count. When using the same reference ranges, the Celltac therefore reports nearly twice as many thrombocytopenic samples than the manual count (15% vs. 8%, Table 2). This instrument seems to have an unusual platelet count error in its feline software that should be corrected. The manufacturer should also consider adding an instrument error flag for poor separation between erythrocytes and platelets.

Significantly more samples were flagged for high HCT in both species when

compared to the manual method while low HCT was found in comparable quantities when compared to the manual count (Table 2). A negative bias and a proportional systematic error was also found in the Bland- Altman plots of the feline samples, but not in the ones for the canine samples (Fig. 2). This systematic error leads to overestimation of HCT values in feline samples above HCT values of 25%. While the clinical impact of this error may be negligible for low and medium HCT values, it may gain clinical significance with high HCT values where deviations of about 9% were detected.

For WBC differential, the manual count was considered the gold standard. Correlation was good for GRAN count between the Celltac and the manual count (which includes neutrophils and basophils, since the Celltac does not differentiate these cells), but poor for LYM, EOS and MONO counts. The difference between the manual count and the Celltac was high for canine LYM count and feline MONO count (Table 2), the 95% limits of agreement are quite wide for these variables and the plots are very spread out (Fig.3 and 4), indicating that the methods do not agree. The difference of the Celltac EOS count to the manual count was very high in both species, and Bland-Altmann plots showed a proportional systematic error (Figure 4). Poor correlations and large differences to the manual count for WBC differential have also been found in other impedance-based instruments[6].

In conclusion, the Celltac alpha is easy to use and maintenance is not very time-consuming. Leukocytic and leukopenic samples are reliably detected with the Celltac. Incomplete results are released for 12% of canine and 25% of feline samples due to error flags. The instrument gives acceptable results for total WBC count, GRAN count, HGB concentration and HCT in canine blood samples, but PLT count is proportionally overestimated. In feline blood samples both low and high PLT counts are inaccurate and a proportional systematic error for HCT leads to overestimation of this variable. The differentiation of lymphocytes, eosinophils and monocytes shows high within-batch imprecision and the results of the Celltac do not agree well with manual differentiation. For reliable WBC differentiation and in case of incomplete results the evaluation of blood smears is often necessary.

3. References

1. Becker M, Moritz A, Giger U. Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. Vet Clin Pathol. 2008;37:373-384.

2. Bienzle D, Stanton JB, Embry JM, Bush SE, Mahaffey EA. Evaluation of an in-house centrifugal hematology analyzer for use in veterinary practice. J Am Vet Med Assoc. 2000;217:1195-1200.

3. Dewhurst EC, Crawford E, Cue S, Dodkin S, German AJ, Papasouliotis K. Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser. J Small Anim Pract. 2003;44:443-448.

4. Papasouliotis K, Cue S, Graham M, Sparkes AH, Gruffydd-Jones T. Analysis of feline, canine and equine hemograms using the QBC VetAutoread. Vet Clin Pathol. 1999;28:109-115.

5. Roleff S, Arndt G, Bottema B, Junker L, Grabner A, Kohn B. Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice. Vet Clin Pathol. 2007;36:155-166.

6. Welles EG, Hall AS, Carpenter DM. Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts. Vet Clin Pathol. 2009;38:20-29.

7. Kondo H, Akiyama T, Tatsumi N, Nagai Y. Performance evaluation of the complete blood count and white blood cell differential parameters obtained using a Celltac F automated hematology analyzer. Lab Hematol. 2004;10:3-13.

8. Nagai Y, Kondo H, Tatsumi N. Validation of platelet counting accuracy with the celltac f automated hematology analyzer. J Autom Methods Manag Chem. 2005;2005:235-239.

9. Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. Vet Clin Pathol. 2009;38:163-174.

10. Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. Vet Clin Pathol. 2009;38:175-182.

11. Pankraz A, Bauer N, Moritz A. Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. Vet Clin Pathol. 2009;38:30-38.

12. Tvedten H, Johansson P. Feline platelet counting with prostaglandin E1 on the Sysmex XT-2000iV. Vet Clin Pathol. 2010;39:190-192.

13. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. Vet Clin Pathol. 2006;35:276-286.

14. Linnet K. Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. Clin Chem. 1999;45:882-894.

15. Bundesärztekammer [Federal Medical Council]. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen [Guidelines of the Federal Medical Council for quality assurance for quantitative laboratory medical examinations]. Dt. Ärzteblatt. 2001;98:A2747-2759.

16. Klee GG. Performance goals for internal quality control of multichannel haematology analysers. Clin Lab Haematol. 1990;12 Suppl 1:65-74.

17. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Desirable Biological Variation Database specifications. http://www.westgard.com/biodatabase1.htm. Accessed 20.10.2011.

18. Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Vinas L, Lavin S. Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. Vet Clin Pathol. 1997;26:138-147.

19. Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clampitt RB. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. Vet Clin Pathol. 2001;30:137-140.

4. Figure Legends

Fig. 1: Bland-Altman plots for comparison of canine and feline WBC count (Fig. 1 a and b) and platelet (PLT) count (Fig. 1 c and d). The results of the Celltac were subtracted from the results of the Sysmex (1 a, b, c) and from the manual count for feline PLT count (1 d). The dashed line shows the bias (Sysmex minus Celltac; manual count minus Celltac), the dotted lines show the 95% limits of agreement. The exact values are annotated at the corresponding lines. The values for mean and median of the reference method and the Celltac are inserted below the figure.

Bias for WBC is close to zero. A negative bias is seen for PLT since the Celltac counts more platelets than the Sysmex (in canine samples) or the observer of the manual method (in feline samples). Both canine and feline blood samples show a trend for increased negative bias when the values for PLT are high.

Fig. 2: Bland-Altman plots for comparison of HGB and HCT. The results of the Celltac were subtracted from the results of the Sysmex for HGB (2 a and b) and from the manual count for HCT (2 c and d). The dashed line shows the bias (Sysmex minus Celltac; manual count minus Celltac), the dotted lines show the 95% limits of agreement.

Bias for HGB is close to zero. When compared to manual PCV values, in feline samples the negative bias is more pronounced than in the canine samples, the Celltac measures higher HCT values than the manual method. A trend for increased negative bias with high HCT values can be seen in the feline samples.

Fig. 3: Bland-Altman plots for comparison of GRAN and LYM count. The results of the Celltac were subtracted from the results of the manual count. The dashed line shows the bias (manual count minus Celltac), the dotted lines show the 95% limits of agreement. Bias is close to zero for both GRAN and LYM counts.

Fig. 4: Bland-Altman plots for comparison of EOS and MONO count. The results of the Celltac were subtracted from the results of the manual count. The dashed line shows the bias (manual count minus Celltac), the dotted lines show the 95% limits of agreement. Bias is negative for EOS count and an increasing negative bias is detectable with higher EOS counts in both feline and canine samples.

5. Figures

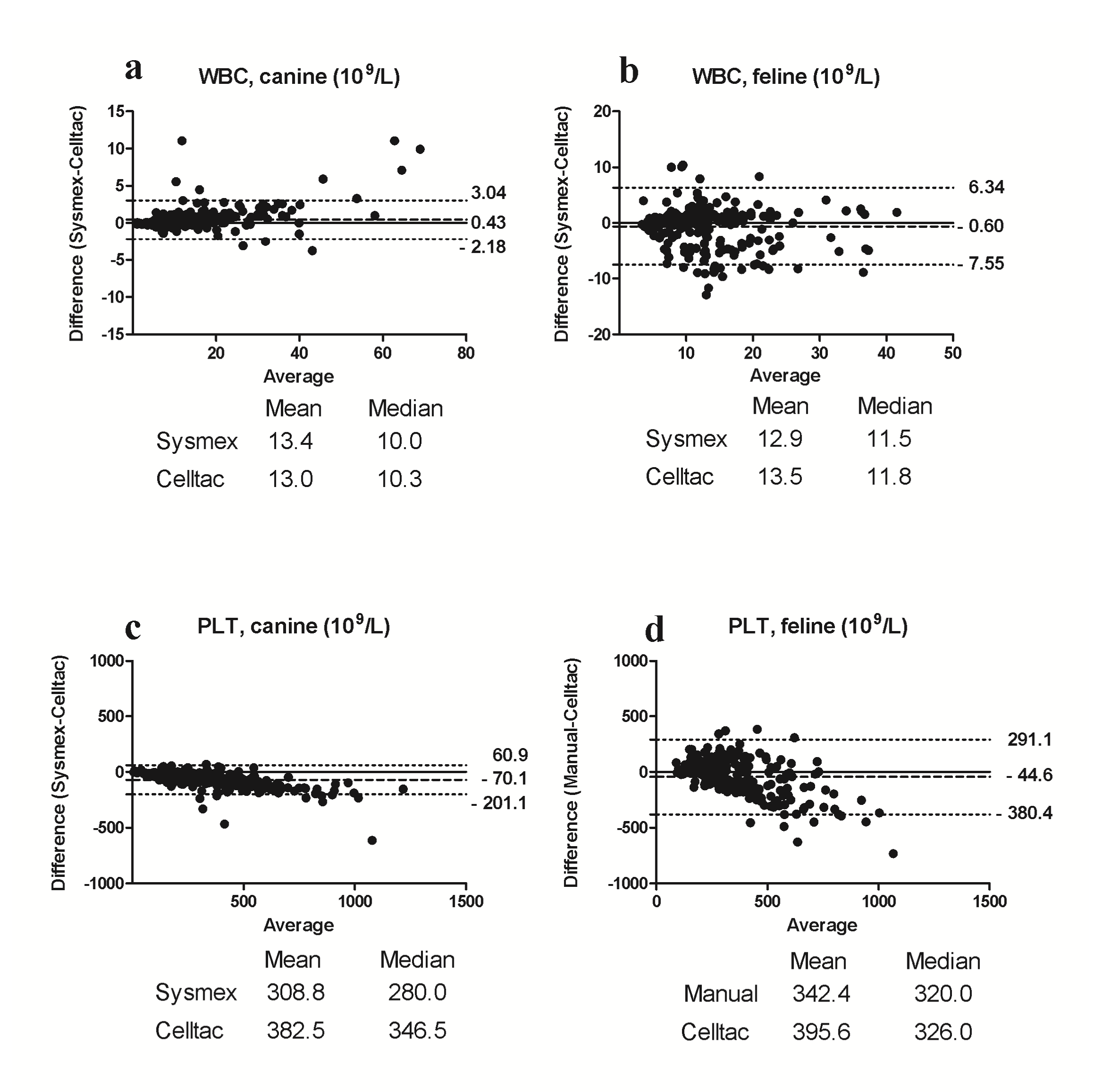


Fig. 1. Bland-Altman plots for comparison of canine and feline WBC count

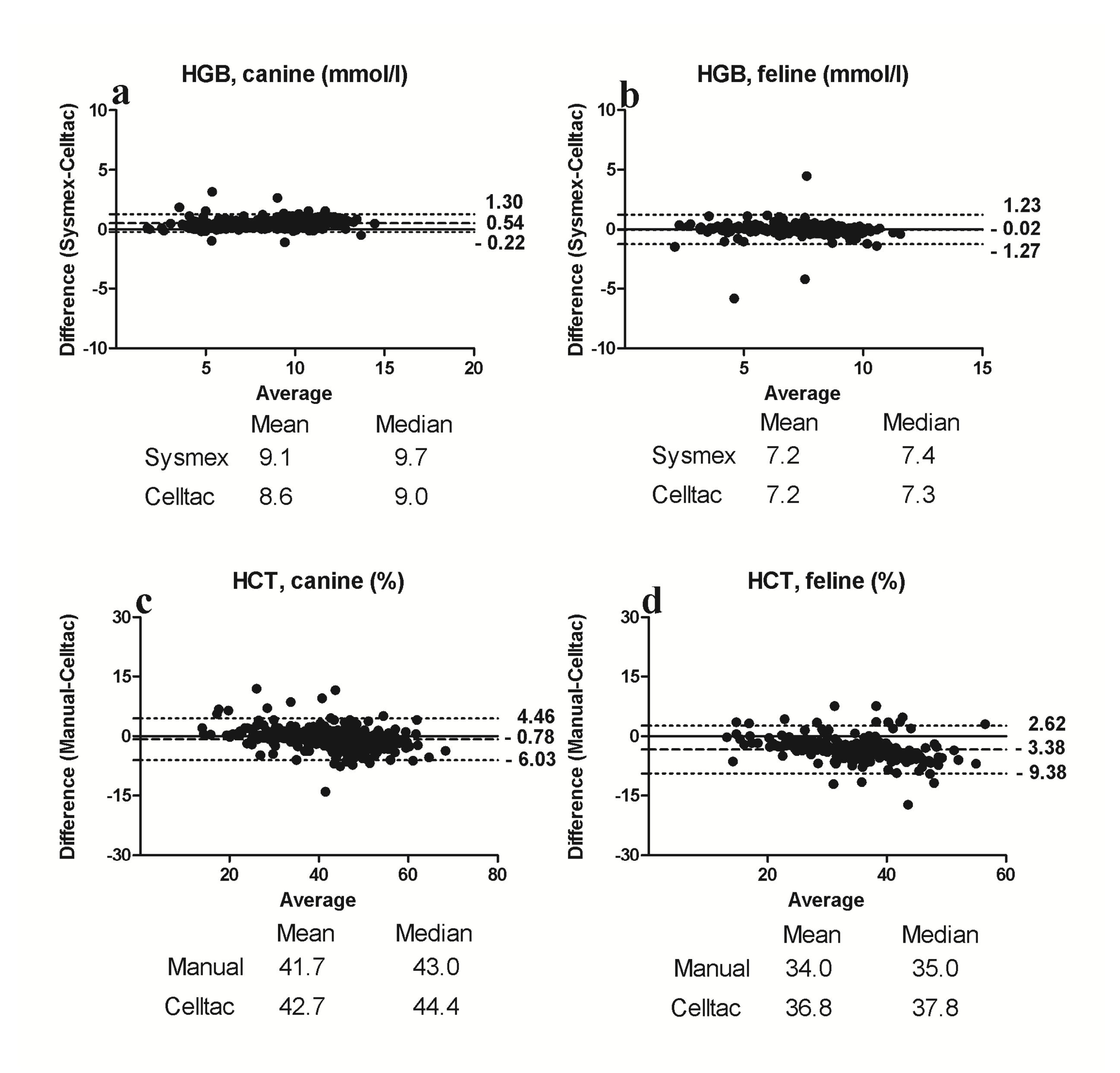


Fig. 2. Bland-Altman plots for comparison of HGB and HCT

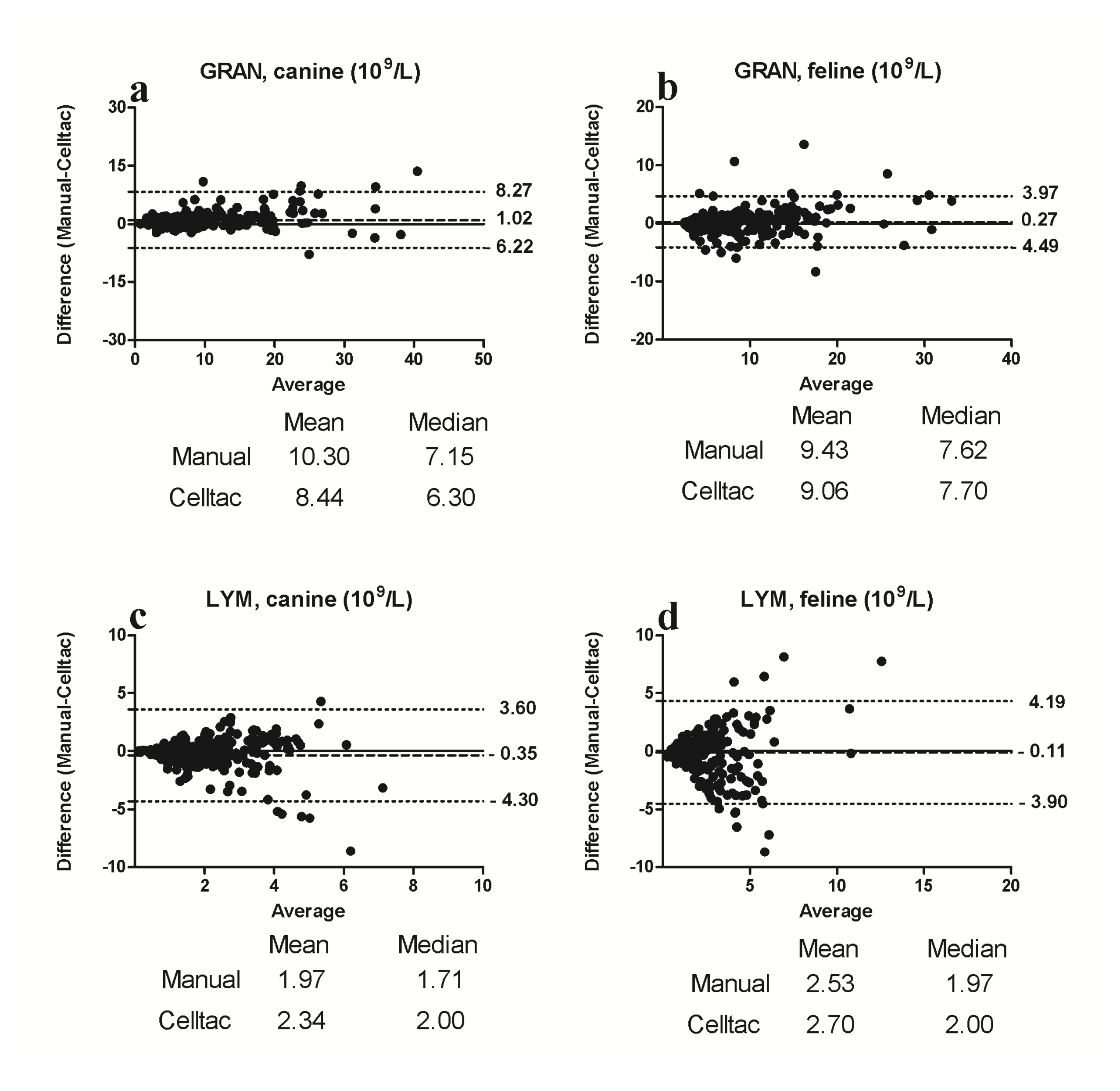


Fig. 3. Bland-Altman plots for comparison of GRAN and LYM count

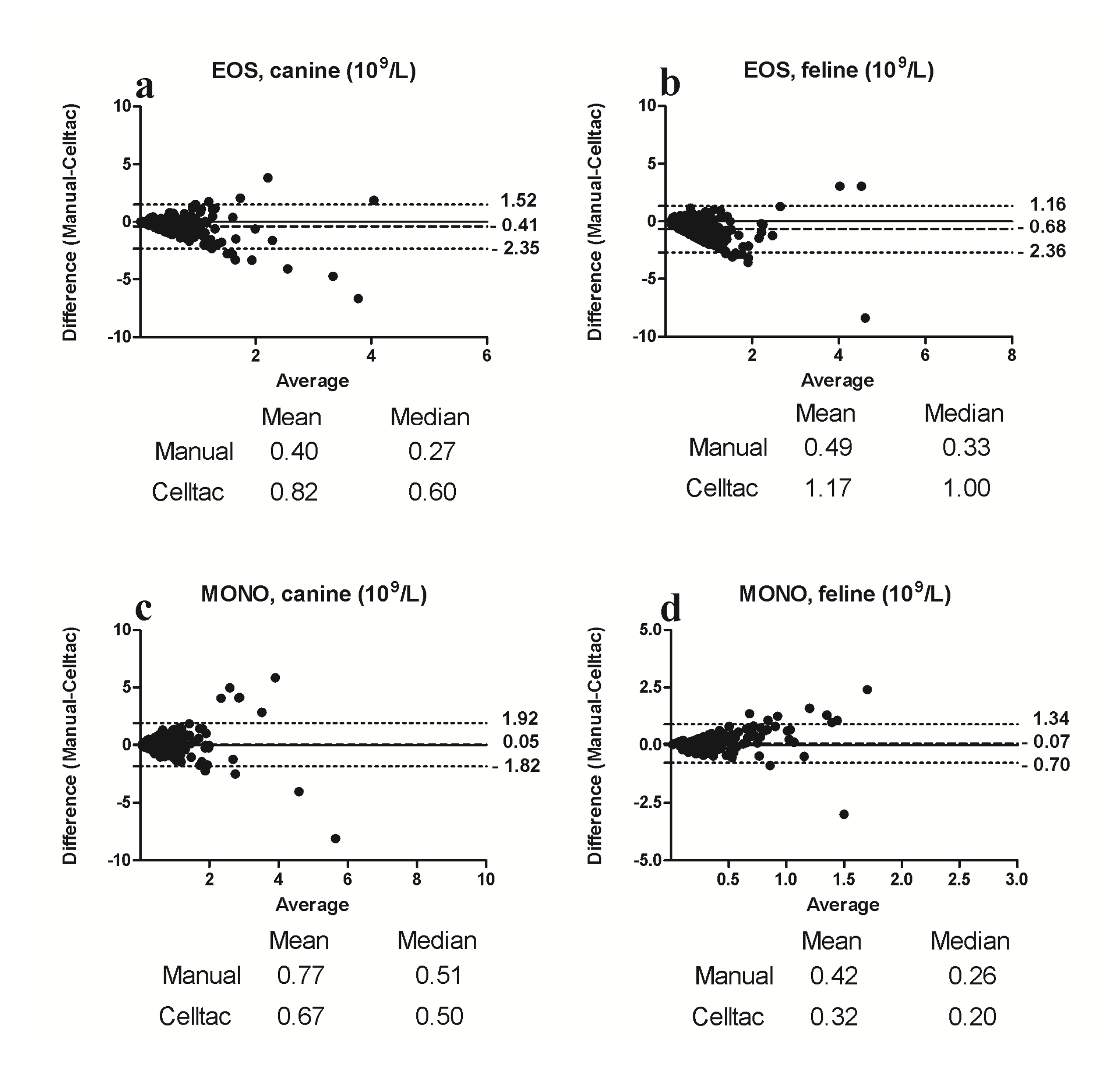


Fig. 4. Bland-Altman plots for comparison of EOS and MONO count

6. Tables

Table 1: Precision of the Celltac. Within-batch precision of ten replicates of five canine and five feline samples. The range of the variation coefficient (CV in %) and the range of data measured in the five samples is shown. Maximum allowed imprecision according to a published guideline for quality assurance of quantitative laboratory assays[15] (*) and the Westgard Biological variation database & desirable quality specifications[17] (#). Between-batch precision, mean and SD of stabilized control samples, 20 measurements of one batch on 20 consecutive days.

		WBC	PLT	HGB	HCT	GRAN	LYM	EOS	MONO
		(10^9/l)	(10^9/l)	(mmol/l)	(%)	(10^9/l)	(10^9/l)	(10^9/l)	(10^9/l)
Within-batch precision dog	CV (%)	2.1 – 2.8	3.6 – 7.2	2.2 – 4.3	1.5 – 2.9	6.0 – 29.5	13.5 – 51.0	28.2 – 94.3	20.8 – 84.2
	Data range	6.4 – 20.6	283 – 409	3.8 – 10.8	21.1 – 51.8	4.2 – 15.3	1.5 – 3.9	0.4 – 1.4	0.3 – 1.7
Within-batch precision cat	CV (%)	1.8 – 3.7	5.5 – 11.9	1.6 – 3.3	1.8 – 3.0	2.1 – 9.3	7.8 – 20.5	24.1 – 40.0	9.4 – 36.9
	Data range	7.9 – 39.8	101 – 648	5.6 – 9.5	28.5 – 46.2	4.6 – 29.1	0.9 – 4.7	0.5 – 5.0	0.1 – 1.1
Max. allowed imprecision	CV (%)	6.0*	7.0*	2.0*	3.0*		5.2#	10.5#	
Between-batch precision control	CV (%)	3.7	6.1	2.2	2.4	4.3	6.4	8.3	10.0
	Mean	7.6	280	8.8	42.3	4.7	2.5	0.35	0.4
	SD	±0.28	±17.0	±0.19	±1.00	±0.20	±0.16	±0.03	±0.04

Table 2: Analytical error flags (Error flag ‘RBC Ghost’: insufficient red blood cell lysis, error flag ‘can’t diff WBC’: unable to analyze the 4-part differential WBC count; &: eight samples were flagged with both errors) and flags for values outside the reference range in canine and feline blood samples. The same samples were flagged ‘outside reference range’ on both analyzers for the variables WBC count, GRAN count and HGB. Values with a statistical significant difference $p < 0.05$ to the Celltac are marked with ***** (Fisher’s Exact test). NA: not applicable

	Reference method	Dogs Celltac	Dogs Reference method	Cats Celltac	Cats Reference method
No. of samples		363	363	260	260
No. of error flags		43 (12%)	NA	66[&] (25%)	NA
RBC ghost		9	NA	30	NA
Can't diff WBC		34	NA	28	NA
Leukocytosis	Sysmex	23%	25%	54%	52%
Leukopenia	Sysmex	4%	3%	13%	13%
Neutropenia	Sysmex	4%	4%	3%	6%
Thrombocytopenia	Sysmex	10%	15%*	NA	NA
Thrombocytopenia	Manual	NA	NA	15%	8%*
High HCT	Manual	4%	2% (PCV)	18%	7%* (PCV)
High Hemoglobin	Sysmex	2%	4%	12%	10%
Low HCT	Manual	21%	23% (PCV)	22%	26% (PCV)
Low Hemoglobin	Sysmex	27%	23%	21%	19%

Table 3: Spearman’s correlation coefficient (r) and median difference in % (% Diff.) of the Celltac results compared to those of the Sysmex or manual methods. NA: not applicable

		Dogs		Cats	
	Comparison	**r**	**% Diff.**	**r**	**% Diff.**
WBC	**Celltac - Sysmex**	0.98	- 1%	0.82	+ 2%
HGB	**Celltac - Sysmex**	0.98	+ 2%	0.91	- 1%
HCT (PCV)	**Celltac - Manual**	0.96	+ 2%	0.93	+ 7%
PLT	**Celltac - Sysmex**	0.95	+ 19%	NA	NA
PLT	**Celltac - Manual**	NA	NA	0.69	+ 2%
GRAN	**Celltac - Manual**	0.93	- 13%	0.90	+ 1%
LYM	**Celltac - Manual**	0.62	+ 15%	0.53	+ 2%
EOS	**Celltac - Manual**	0.12	+ 56%	0.09	+ 67%
MONO	**Celltac - Manual**	0.41	- 2%	0.41	- 30%

7. Letter of Acceptance

Von: Weber, Karin
Gesendet: Mittwoch, 17. Oktober 2012 09:37
An: Barbara von Beust
Betreff: AW: VCP-11-1756.R3

Dear Dr. von Beust

please find attached the edited version. Authors names/ affiliations/ address are verified and do not need any changes.

The proposed changes have been accepted in the text and the comments have been taken care of except comment #1 which I also commented on because I don't understand it (see text).

Thank you ver much for your time and effort in the editing process.

Kind regards

Karin

Von: Barbara von Beust [mailto:barbara.vonbeust@bluewin.ch]
Gesendet: Samstag, 13. Oktober 2012 01:03
An: karin.weber@lmu.de
Betreff: VCP-11-1756.R3

13 October 2012

Dear Dr. Weber,

Your article entitled "*Validation of the automated Hematology Analyzer Celltac Alpha for canine and feline blood samples"* is being edited for publication in Veterinary Clinical Pathology. It will be an excellent contribution to an upcoming issue of the journal. Your article has been edited for grammar, style, and consistency. Please refer to the attached Word document and consider the editorial suggestions, comments listed in the manuscript and questions listed below in this message (also attached). I would appreciate receiving your response within 14 days.

I suggest you may make your revisions directly on the attached manuscript in track mode, either by accepting the proposed changes or by further editing. Once these changes are made or approved, your article will be sent to the publisher for copyediting and layout. You will have the opportunity to review the final proofs of the article prior to publication.

Please let me know if you have any questions. I appreciate your consideration and look forward to working with you towards the publication of your paper.

Dr. Barbara R. von Beust
Co-Editor-in-Chief
Veterinary Clinical Pathology

Changes have been made throughout the text to conform to journal style and use of language. Please read the entire manuscript very carefully to ensure that

unintentional changes in meaning have not occurred.

1) **Title: -**

2) **Names, Co-authors, Affiliations**: Please confirm **names and affiliations of all authors**. Affiliations of all authors should be where they were at the time the work was performed.

3) **Mailing and E-mail address**: Please verify your mailing and email addresses.

4) **Key words: -**

5) **Abstract:** The abstract has been edited. Please confirm it is OK.

a) **Introduction section** Please confirm rephrasing is OK.

b) **Materials and methods section**: Please confirm rephrasing is OK and address comments.

c) **Results section**: Please confirm rephrasing is OK and address comments.

d) **Discussion section:** Please confirm rephrasing is OK. Please address issues addressed in comments and edit unclear statements.

6) **References**: References and reference citations – please address comment for ref. 17.

7) **Acknowledgements: -**

8) **Tables: -**

9) **Figures:** Figure captions have been slightly edited, please accept of edit.

Please see also Author Guidelines at http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291939-165X/homepage/ForAuthors.html).

IV. DISKUSSION

Die Blutanalyse ist ein wichtiger Bestandteil des diagnostischen Vorgehens in der Veterinärmedizin. Kompakte automatisierte hämatologische Analysegeräte mit einem begrenzten Angebot an analysierbaren Parametern werden trotz begrenzter Kapazität für Tierarztpraxen als nützlich erachtet. Geräte mit weniger analysierbaren Parametern haben einen niedrigeren Anschaffungspreis und geringeren Wartungsaufwand als komplexe Systeme welche in kommerziellen Laboren zu finden sind, und können dennoch belastbare Ergebnisse zeitnah in der eigenen Einrichtung liefern.

Manuelle Methoden sind zeitaufwändig und personalintensiv. Insbesondere bei der manuellen Zellzählung und -differenzierung ist ein hoher Grad an Variation der Ergebnisse, abhängig von der subjektiven Einschätzung und den Fähigkeiten der durchführenden Person festzustellen, so dass die Messunsicherheit steigt. Durch Analyse vor Ort kann auch die Alterung der Blutprobe durch den Versand an ein externes Labor als mögliche Fehlerquelle für ein falsches Ergebnis vermieden werden.

Wichtige Parameter, die im Entscheidungsprozess bei der Anschaffung eines automatischen Analysegerätes berücksichtigt werden sollten, sind Präzision, Richtigkeit, Messgeschwindigkeit, Benutzerfreundlichkeit sowie die Kosten für die Analyse einzelner Proben.

VERGLEICHSMETHODEN

Die Messergebnisse des in dieser Studie zu validierenden Gerätes Celltac alpha wurden mit denen des XT2000iV (Sysmex) verglichen. Bei der Erfassung der Thrombozytenzahlen bei Katzen, Hämatokrit bei Hunden und Katzen sowie die Differenzierung der Leukozyten wurde eine manuelle Auszählung als Vergleichsmethode der Wahl herangezogen.

Obgleich die manuelle Auszählung aufgrund der Variation in der Durchführung und/oder Auswertung unpräzise sein kann und damit eine Messunsicherheit mit sich bringt, stellt diese dennoch die Referenzmethode für die Auswertung von Thrombozytenzahlen bei Katzen und der Erstellung eines Leukozyten-Differentialblutbildes bei Hunden und Katzen dar.

Der Sysmex wurde aus diversen Gründen als besonders geeignetes Vergleichsgerät erachtet. Es existieren bereits zahlreiche Validierungsstudien und das Gerät ist deutlich höher technisch ausgestattet als der Celltac. Die Möglichkeit Thrombozyten sowohl durch Impedanz als auch durch optische Erfassung analysieren zu können, war hinsichtlich der Problematik bei der Zählung der Thrombozyten in Proben von Katzen von besonderem Interesse. Aufgrund der bekannten Problematik mit Impedanz-basierter Messung, wurde bei Katzenproben standardmäßig die im optischen Kanal gemessenen Thrombozytenwerte (PLT-O) verwendet.

ERGEBNISSE

Der Celltac alpha konnte zuverlässig Leukopenien und Leukozytosen in Proben von Hunden und Katzen erkennen. Somit waren die Messungen zur Leukozytengesamtzahl belastbar. Die klinikeigenen Referenzbereiche wurden bei allen hier angewendeten Methoden berücksichtigt und durch Softwareeinstellungen im Sysmex und Celltac hinterlegt. Die Messungen zur Anzahl der Granulozyten, der Hämoglobinkonzentration sowie dem Hämatokrit bei Hunden wiesen eine akzeptable Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Referenzmethoden auf.

Die Ergebnisse der Leukozytendifferenzierung (Zellzahlen für Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten) stimmen nicht in ausreichendem Maß mit denen der manuellen Auswertung überein. Dadurch, dass die manuelle Auszählung aktuell den Goldstandard darstellt, ist die Nützlichkeit der Leukozytendifferenzierung mithilfe des Celltacs im klinischen Einsatz in Frage zu stellen.

ERGEBNISSE THROMBOZYTEN

Seit 1988 gilt international die manuelle Auszählung der Thrombozyten als der Goldstandard (ICSH, 1988). Die Präzision dieser Methode wird allerdings nicht als zufriedenstellend angesehen. In der Humanmedizin wird die Variation mit Variationskoeffizienten von 10 - 25% beschrieben, wenn die Auszählung von verschiedenen Personen durchgeführt wird (Harrison et al. 2000). Präzisere Thrombozytenmessung liefert der Sysmex durch Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Bei Hunden, Katzen und Pferden wurden bei der Auszählung im optischen Kanal (PLT-O) Variationskoeffizienten von 2-4%

erreicht (Lilliehook and Tvedten 2009a).

Bei der Thrombozytenmessung mit dem Celltac wurde generell eine negative Abweichung (Bias) zur manuellen Auszählung (Katzen) und zu den Werten des Sysmex (Hunde) festgestellt, der sich als proportionaler systematischer Fehler erwies. Dabei wurden speziell bei Katzenproben mit normalen und Werten im oberen Referenzbereich permanent höhere Thrombozytenwerte ausgewiesen als durch die jeweilige Vergleichsmethode. Somit wurden die Thrombozytenwerte als fälschlich hoch ausgewiesen. Dies hatte zur Folge, dass Proben weniger häufig mit Thrombozytopenie gekennzeichnet wurden. Bei Proben mit geringen Werten von 90 – 260 x 10^3 Zellen/µL wurde die Thrombozytenzahl wiederum unterschätzt.

Thrombozyten der Katze können aufgrund von Polymorphologie und der Tendenz zur Aggregation nur schlecht mit der Impedanzmethode gezählt werden und werden aufgrund der sich überschneidenden Zellgrößen, häufig als Erythrozyten gezählt (Norman et al. 2001a, Pastor et al. 1997). Diese fehlerhafte Zuweisung führt eigentlich zu niedrigeren Thrombozytenwerten und somit zu häufigeren Meldungen einer Thrombozytopenie. Nach diesen Gegebenheiten besteht somit bei den meisten Geräten die Gefahr einer fehlerhaften Meldung einer Thrombozytopenie, die als Pseudothrombozytopenie einzuordnen ist. Eine „echte“ Thrombozytopenie (< 200 x 10^3 Zellen/µL) bei Katzen ist selten, wie in einer retrospektiven Analyse von 3300 Katzenblutproben gezeigt wurde. Nur 41 (1,2%) der Katzen hatten eine "echte" Thrombozytopenie (Jordan et al. 1993). In einer weiteren Studie mit 359 Katzen, wurden eine Rate von 71% Thrombozytopenie mithilfe impedanzbasierter Geräten erhoben. Nach manueller Auszählung in diesem Versuch hatten jedoch nur 11 Proben (3,1%) tatsächlich einen Thrombozytenwert von < 200 x 10^3 Zellen/µL (Norman et al. 2001a).

Um Aggregatbildung zu vermeiden, wurde in einer Studie zusätzlich zu EDTA Prostaglandin E1 den Blutproben von Katzen beigemischt. Als diese im optischen Kanal vom Sysmex XT2000iV gemessen wurden, wurden weniger Pseudothrombozytopenien ausgewiesen als durch Vergleichsmethoden. Somit konnte gezeigt werden, dass mithilfe weiterer Bearbeitung der Blutproben von Katzen möglicherweise eine zuverlässigere Aussage über den Thrombozytenstatus von Katzen möglich ist (Tvedten and Johansson 2010).

Wie Studien belegen, ist die Unterausweisung von Thrombozyten aufgrund der Überschneidung in Zellgröße zu Erythrozyten ein Problem, welches aktuell technisch noch nicht komplett zu lösen ist. Eine Überausweisung aufgrund der Kalibrierung der Software liefert dennoch auch keine Lösung dieses Problems. Es sollte überdacht werden seitens des Herstellers die Software diesbezüglich anzupassen und eine weitere Fehlermeldung zu integrieren, die auf mangelhafte Trennung von Erythrozyten und Thrombozyten hinweist.

ERGEBNISSE HÄMATOKRIT

Erhebliche Unterschiede bei den Hämatokritmessungen von Katzenproben wurden zwischen dem Celltac, dem Sysmex und der manuellen Methode festgestellt. Laut Messungen des Celltacs, wiesen etwa die dreifache Anzahl der Proben Hämatokritwerte außerhalb des oberen Referenzbereichs (> 44%) auf als die Messungen des Sysmex und die der manuellen Methode ergaben. Hämatokrit (packed cell volume, PCV) ist der Volumenanteil von Erythrozyten (%) am Gesamtblutvolumen. Die Parameter MCV und Erythrozytenanzahl wurden in dieser Studie nicht explizit verglichen zwischen verschiedenen Methoden. Denkbar wäre dennoch, dass falls zahlreiche Thrombozyten als Erythrozyten gemessen werden, die gemessene Erythrozytenanzahl dadurch erhöht werden würde. Eine erhöhte Erythrozytenanzahl würde proportional zu einem erhöhten Hämatokritwert führen. Weitere Auswertungen wären erforderlich um diese Theorie zu bestätigen.

ERGEBNISSE LEUKOZYTEN

Die manuelle Methode wurde als Goldstandard zur Leukozytendifferenzierung angesehen. Einzelne Subpopulationen der Leukozyten wurden zuverlässig detektiert. Die Messungen von Granulozyten der automatischen und manuellen Methoden entsprechen einander mit hoher Korrelation und lediglich geringen Abweichungen (Bias), während Ergebnisse der Lymphozytenmessungen nur geringe Korrelation aufweisen mit hoher Streuung der Datenpunkte bei Hunden und Katzen.

Geringe Abweichungen (Bias) wurden bei den Zellzahlen für eosinophile Granulozyten und Monozyten festgestellt. Bei höheren Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten wurde jedoch ein Trend zur Überschätzung durch den Celltac ersichtlich. Die Übereinstimmung der Werte beider Zellarten zu anderen

Methoden war sehr gering. Da der Vergleich zwischen dem XT2000iV und der manuellen Methode gute Korrelation für Lymphozyten, Eosinophilen und Monozyten zeigte, kann die Schlussfolgerung, dass der Celltac nicht sehr akkurat bei der Differenzierung dieser Zelltypen, ist erfolgen.

MESSSICHERHEIT

Die Richtigkeit der Messungen des Celltacs wurde anhand des Vergleichs zum Sysmex XT2000iV und zu manuellen Methoden bewertet. Die Überschneidung der verschiedenen Ergebnisse kann erfahrungsgemäß nicht bei 100% liegen, allerdings ermöglicht eine Evaluierung mittels Bland-Altman-Analysen die Beurteilung der allgemeinen Abweichung des neuen Gerätes im Vergleich zu etablierten Methoden.

Die Ergebnisse des Celltacs für Leukozytenzahlen und Hämoglobinkonzentration können als akkurat für beide Tierarten betrachtet werden, da die Korrelation hoch, während die Abweichungen zu anderen Methoden gering und klinisch nicht relevant waren. Ergebnisse zu Hämatokrit bei Hunden gemessen durch den Celltac stimmten in hohem Maße mit Ergebnissen vom XT2000iV sowie manueller Erhebung überein. Dagegen zeigte sich bei den Ergebnissen des Hämatokrit bei Katzen ein systematischer Fehler, wodurch höhere Werte berichtet wurden als die manuelle Auszählung ergaben, wie durch den dazugehörigen Bland-Altman Plot und einer Abweichung (Bias) von -44,6 deutlich wurde. Es zeichnet sich ein Trend zur größeren Abweichung in Abhängigkeit von ansteigenden Mittelwerten ab.

Die Messungen des Celltacs zeigten, dass Katzen im Vergleich zu anderen Messmethoden vermehrt einen über dem physiologischen Referenzbereich liegenden Hämatokrit aufweisen. Dieser Effekt könnte auf die falsche Zuordnung von Thrombozyten als Erythrozyten aufgrund der überlappenden Zellgröße zurückzuführen sein. Leider liegen in dieser Studie keine expliziten Werte zu MPV und Erythrozytengesamtzahl vor. Somit müssten hierzu weitere Untersuchungen getätigt werden, um die genau Ursache für den erhöhten Hämatokritwert bei Katzenproben zu erklären. Die klinische Relevanz dieses Fehlers hält sich für niedrige und mittlere Hämatokritwerte in Grenzen, bei hohen Werten kann eine Relevanz bestehen, da eine Abweichung von 9% festgestellt wurde.

Eine Aussage über den hämatologischen Zustand eines Hundes in Behandlung mithilfe der Gesamtanzahl der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten ist mit hoher Messsicherheit durch den Celltac möglich. Die zuverlässige Kennzeichnung des Celltacs der abnormalen Proben bei Hunden wird durch die hohe Überschneidung der Werte zwischen den Geräten und den manuellen Methoden bei Leukozytose, Leukopenie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Hämatokrit außerhalb des Referenzbereiches verdeutlicht. Diese Hinweise haben durchaus klinische Relevanz, um beispielsweise weitere diagnostische Schritte einzuleiten oder um die Kontraindikation einer Therapie zu stellen.

PRÄZISIONSMESSUNGEN

Präzisionsmessungen wurden in dieser Studie nur für den Celltac durchgeführt und anhand des Variationskoeffizienten bewertet. Der Variationskoeffizient (%) zeigt das relative Streuungsmaß.

Die Präzision des Celltacs innerhalb einer Messwertreihe (within run) in Bezug auf Leukozytenzahl und Hämoglobinkonzentration (WBC < 4%, HBG ≤ 4,3%) war im Vergleich zu anderen Analysegeräten wie dem Sysmex (WBC ≤ 1,77%, HGB = 0,93%) und den sieben von Becker et al. evaluierten Analysegeräten (WBC 1,4 - 3,2%, HGB 0,6 - 2,9%) unterlegen (Becker et al. 2008, Lilliehook and Tvedten 2009a). Jedoch waren die Ergebnisse nach aktuell publizierten Referenzbereichen noch ausreichend für die Analyse von Hund- und Katzenproben (Klee 1990, Bundesärztekammer 2001). Auswertungen des Hämatokrit mit einem Variationskoeffizient ≤ 3% wurde für sowohl Hunde- als auch Katzenproben erreicht. Da die manuelle Zählung von Thrombozyten aufwändig, ungenau und zeitintensiv ist, ist eine zuverlässige automatisierte Zählung durchaus wünschenswert. Multiple Messungen des Celltacs anhand Thrombozyten zeigten geringere Präzision als Messungen des Hämatokrit, wobei bei Katzen (≤ 11,9%) eine geringere Präzision als bei Hunden (≤ 7,2%) erreicht wurde. Die Ergebnisse sind für beide Tierarten für den klinischen Gebrauch ausreichend präzise, wobei hier erneut die Richtigkeit hinterfragt werden muss. Die maximal zulässigen Variationskoeffizienten bei der Leukozytendifferenzierung wurden nicht eingehalten (Bundesärztekammer 2001, Ricos 1999). Die manuelle Methode gilt weiterhin als Goldstandard in der Leukozytendifferenzierung aufgrund der Messsicherheit obgleich

Variationskoeffiziente von 10 bis 25%, in der Humanmedizin dokumentiert wurden (Harrison et al. 2000). Die Gesamtanzahlen der Monozyten und eosinophilen Granulozyten weisen beim Hund eine höhere Variabilität auf als bei der Katze und auch hier sind die erreichten Variationskoeffizienten denen der Messungen vom Sysmex unterlegen. Eine breitere Datenstreuung kann auf der geringen Anzahl der einzelnen Zelltypen basieren, allerdings ist der Celltac im Vergleich zu anderen Instrumenten in Bezug auf die Präzision durchgehend unterlegen.

Im Rahmen von Studien wurden ebenfalls Präzisionsmessungen zur Leukozytendifferenzierung innerhalb einer Messreihe mit dem Sysmex XT2000iV anhand von Patientenproben durchgeführt. Die Variationskoeffizienten bei der Präzisionsmessungen mit dem XT2000iV waren durchweg niedriger (Lilliehook and Tvedten 2009b), bei Lymphozyten sogar mehr als eine Zehnerpotenz (Lymphozyten VK Celltac 7,8 – 51,0%, VK XT2000iV 1,5 – 3,4%) als die der Messungen des Celltacs. Der Vergleich ist nur bedingt möglich, da diese Daten nicht im Rahmen derselben Studie erhoben wurden.

Die spezifische Identifikation der basophilen Granulozyten ist durch den Celltac nicht gegeben. Basophile Granulozyten werden stattdessen laut Angaben des Herstellers im Granulozytenkanal gemessen. Der Sysmex XT2000iV führt im Rahmen der Leukozytendifferenzierung die Gesamtanzahl für basophile Granulozyten für Proben von Hunden und Katzen auf. Dadurch, dass diese Methode aber auf die Eigenschaften von basophilen Granulozyten von Menschen beruht und diese von den veterinärmedizinischen Gegebenheiten abweichen, insbesondere in Bezug auf die Lyseresistenz der Zellen, sind die Ergebnisse leider nicht zuverlässig (Lilliehook and Tvedten 2009b).

FEHLERMELDUNGEN

Bei den ausgewerteten Katzenproben wurde bei 25% der Proben eine Fehlermeldung durch den Celltac angezeigt. Folglich müsste in der Praxis jede vierte Probe mittels der aufwändigeren manuellen Auszählung oder durch andere Geräte nochmals analysiert werden, vorausgesetzt es wurde genügend Probenmaterial am Patient dafür gewonnen.

Bei 38 Katzenproben (15%) wurde die Fehlermeldung für rückständige Erythrozytenmembranen (RBC-Ghost) herausgegeben. Dies könnte

möglicherweise ein Indiz dafür sein, dass Erythrozyten von Katzen resistenter gegen die vom Celltac verwendete Lysereagenz sind, als die anderer Spezies. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass das Plasma und die Erythrozyten von Katzen eine andere Osmolarität haben als das Plasma von Menschen (Chew et al. 1991) und die Herstellung der Reagenzien sich primär nach den Charakteristika von menschlichen Blutproben richten.

Bei 34 der Hunde- und 36 der Katzenproben (9% und 14% respektive) konnte das vierteilige Differenzialblutbild, auch nach wiederholtem Messen mit verändertem Verdünnungsverhältnis nicht erstellt werden. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang erkannt werden, weshalb diese Proben nicht vollständig analysiert werden konnten.

Auch bei anderen automatischen Analysegeräten, wie dem LaserCyte (Wenger-Riggenbach et al. 2006), dem CA530-Vet (Roleff et al. 2007) und dem Sysmex (Lilliehook and Tvedten 2009b) wurden Probleme der vollständigen Differenzierung der Leukozyten in vergleichbarem Maße beschrieben. Dies gilt ebenso für in der Humanmedizin verwendete, hochwertige Geräte wie dem Sysmex XT2000i, der das Pendant zum in der Veterinärmedizin eingesetzten XT2000iV darstellt. So berichten Leers et al. in ihrer Studie bezüglich der Differenzierung von Leukozyten von Fehlermeldungen bei 21% der Proben, die durch den XT2000i gemessen wurden und folglich eine weitere Bearbeitung erforderten (Leers et al. 2011).

Dies lässt erkennen, dass die automatisierte Analyse von Blutproben von Patiententieren, welche Abweichungen von den Referenzbereichen aufweisen, weiterhin eine technische Herausforderung darstellt. In der Tiermedizin bereiten vor allem die Differenzierung der Leukozyten und die Zählung der Thrombozyten bei Katzen Probleme, so dass die manuelle Probenbearbeitung weiterhin unumgänglich für eine zuverlässige Auswertung der Proben bleibt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend, ist der Celltac alpha leicht zu bedienen und fordert nur geringen Wartungsaufwand. Proben von Patienten mit Leukozytose oder Leukopenie werden erfolgreich detektiert. Unvollständige Ergebnisse im Zusammenhang mit Fehlermeldungen werden bei bis zu 25% der Katzen berichtet. Das Gerät liefert im Vergleich zu Referenzmethoden (manuell und Sysmex XT2000iV) übereinstimmende Ergebnisse für Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Granulozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit bei Hundeblutproben. Bei Katzenblutproben sind die Ergebnisse ebenfalls belastbar für Leukozytenzahl, Granulozytenzahl und Hämoglobinkonzentration, aber systematische Fehler sind bei der Messung von Thrombozyten und Hämatokrit vorhanden. Bei hohen Hämatokritwerten kann dieser Fehler auch klinisch signifikant sein. Ein möglicher Softwarefehler, der die Überausweisung der Thrombozytenzahl zur Folge hat sollte durch den Hersteller geprüft werden und die Software dementsprechend angepasst werden. Die Programmierung einer zusätzlichen Fehlermeldung für mangelhafte Differenzierung von Thrombozyten und Erythrozyten könnte für den Anwender ein wichtiger und hilfreicher Hinweis sein. Die Differenzierung von Lymphozyten, Eosinophilen und Monozyten ist nicht zuverlässig für Proben beider Tierarten, mit sehr geringer Übereinstimmung zur Vergleichsmethode und niedriger Präzision. Um eine zuverlässige Leukozytendifferenzierung zu gewährleisten, ist die manuelle Evaluierung der Blutausstrichen erforderlich.

Zu den Vorteilen des Celltacs zählen, neben der kurzen Einarbeitungszeit aufgrund der intuitiven Benutzeroberfläche und dem minimalen Zeitaufwand für Wartung und Kalibrierung, vor allem das geringe erforderliche Probenvolumen von 30 µl. Da häufig nur sehr geringe Volumina an Patientenproben gewonnen werden können, berücksichtigt das Design des Gerätes einen wichtigen Aspekt der Kleintiermedizin.

Allerdings kann das Gerät lediglich zur Anwendung im Rahmen eines kleinen Blutbildes empfohlen werden und es muss bei der Nutzung berücksichtigt werden, dass die Parameter Thrombozyten bei Hunden und Katzen sowie Hämatokrit bei Katzen systematischen Fehlern unterliegen und manuell überprüft werden müssen.

VI. SUMMARY

The objective of this study is the clinical validation of the fully automated hematology analyzer, Celltac alpha (MEK-645, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) for feline and canine blood samples collected within routine diagnostic workups in the Clinic of Small Animal Medicine, LMU, Munich, Germany. This was accomplished using a systematic comparison of the analyses from the Celltac alpha and two established techniques: manual methods and the Sysmex XT2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

A total of 623 blood samples (363 canine, 260 feline) were analyzed. Manual methods were used for the leukocyte differential count, hematocrit (packed cell volume), and feline platelet count. The output of the new instrument was analyzed to determine its precision and its ability to flag erroneous or incomplete results. Correlation and Bland-Altman analyses were used to compare the methods.

The within-batch precision of the Celltac was evaluated using five canine and five feline samples which were each analyzed ten times consecutively. The results showed acceptable coefficients of variation for the leucocyte count (< 4%), platelet count (< 8%), hemoglobin concentration (< 3%), and hematocrit (< 3%), while precision was poor for leukocyte subpopulations. Comparing these values to another trial conducted by Lilliehook and Tvedten (2009), the Sysmex showed consistently superior precision values to the Celltac, albeit that this is a cross-trial comparison.

Leukopenia and leukocytosis were reliably detected with the Celltac. The hemoglobin concentration and the leukocyte count agreed well with the comparator methods. The coefficient of variation for the granulocyte count was 2 - 9% in cats and 6 - 29% in dogs. The coefficient of variation of the lymphocyte count was 8 - 20% in cats and 13 - 51% in dogs. Negative biases as well as proportional systematic error were apparent for platelet count, feline hematocrit concentration, and eosinophil count. Analytical error flags and incomplete results were reported for 11.8% of canine and 25.4% of feline samples. This is a relevant aspect for the clinical setting, since this portion of samples requires further processing and evaluation, consuming resources and time.

To conclude, the Celltac alpha is easy to use and maintain. Samples with

leukocytosis or leukopenia were reliably detected with the Celltac. Incomplete results were often returned due to error flags, which was the case for every fourth feline sample. Thereby, re-evaluation and the use of manual methods become necessary. The instrument gives acceptable results for total leukocyte count, platelet count, granulocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit in dog blood samples. In feline blood samples, both low and high platelet counts are inaccurate, and a systematic error for hematocrit leads to overestimation of this parameter. For high hematocrit values, this error may be of clinical significance. The differentiation of lymphocytes, eosinophils and monocytes appears to be not very accurate for both species with very low correlations and low intra-assay precision. For reliable WBC differentiation, and in case of incomplete results, the evaluation of blood smears remains necessary.

VII. Literaturverzeichnis

American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) (2009). Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology. Aufrufbar im Internet. URL: www.asvcp.org. Stand 26.05.2014

Bain, B. J. & Huhn, D. (1997) Roche Grundkurs Hämatologische Morphologie, 1., Aufl. edn. Thieme, Stuttgart. p 328

Bayer Health Care (2004) ADVIA 120 Operator's Guide

Becker, M., Moritz, A. & Giger, U. (2008) Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. *Vet Clin Pathol* **37**, 373-384

Bourgès-Abella, N., Geffré, A., Concordet, D., Braun, J. P. & Trumel, C. (2011) Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin Pathol* **40**, 303-315

Briggs, C., Carter, J., Lee, S. H., Sandhaus, L., Simon-Lopez, R., Vives Corrons, J. L. & International Council for Standardization in, H. (2008) ICSH Guideline for worldwide point-of-care testing in haematology with special reference to the complete blood count. *Int J Lab Hematol* **30**, 105-116

Bundesärztekammer, F. M. C. (2001) Bekanntmachungen: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl International* **98**, A2747-A2759

Chew, D. J., Leonard, M. & Muir, W. W., 3rd (1991) Effect of sodium bicarbonate infusion on serum osmolality, electrolyte concentrations, and blood gas tensions in cats. *American journal of veterinary research* **52**, 12-17

Dotson, M.A.(1998) Multiparameter Hematology Instruments. In: Stiene-Martin E.A., Hrsg. Clinical -Hematology. Zweite Aufl.Philadelphia: Lippincott-Raven, 519-551

England, J. M., Rowan, R. M., van Assendelft, O. W., Bull, B. S., Coulter, W. H., Fujimoto, K., Groner, W., Jones, A. R., Koepke, J. A., Lewis, S. M., Shinton, N. K.,

Tatsumi, N., Thom, R., Verwilghen, R. L. & McLaren, C. E. (1994) Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. *Clin Lab Haematol* **16**, 157-174

Fernandes, B. & Hamaguchi, Y. (2003) Performance characteristics of the Sysmex XT-2000i hematology analyzer. *Lab Hematol* **9**, 189-197

Flatland, B., Freeman, K. P., Friedrichs, K. R., Vap, L. M., Getzy, K. M., Evans, E. W. & Harr, K. E. (2010) ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol* **39**, 264-277

Flatland, B. Freeman, K.E., Vap, L.M., Harr, K.E. (2013) ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* **42**, 405-423

Fujimoto, H., Sakata, T., Hamaguchi, Y., Shiga, S., Tohyama, K., Ichiyama, S., Wang, F. S. & Houwen, B. (2000) Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* **42**, 371-378

Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A. & Lange, S. (2007) Vergleich von Messmethoden. *Dtsch med Wochenschr* **132**, e69-e73

Harrison, P., Horton, A., Grant, D., Briggs, C. & MacHin, S. (2000) Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* **108**, 228-235

Hill, V. L., Simpson, V. Z., Higgins, J. M., Hu, Z., Stevens, R. A., Metcalf, J. A. & Baseler, M. (2009) Evaluation of the Performance of the Sysmex XT-2000i Hematology Analyzer With Whole Bloods Stored at Room Temperature. *Lab Med* **40**, 709-718

ICSH (1967) Recommendations for Haemoglobinometry in Human Blood. *Br J Haematol* **13**, 71-75

Inczédy, J., Lengyel, T., Ure, A. M. & International Union of Pure and Applied Chemistry. (1998) Compendium of analytical nomenclature : definitive rules 1997, 3rd edn. Blackwell Science, Osney Mead, Oxford ; Malden, MA

Jackson, J. F. (1961) Supravital Blood Studies, Using Acridine Orange Fluorescence. *Blood* **17**, 643-649

Jain N. C., Hrsg. (1993) Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Wiley.-Blackwell

Jensen AL, K.-H. M. (2010) Diagnostic Test Validation In: Schalm's Veterinary Hematology Ed W. K. Weiss DJ. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. 1027-1034

Jensen, A. L. & Kjelgaard-Hansen, M. (2006) Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* **35**, 276-286

Jordan, H. L., Grindem, C. B. & Breitschwerdt, E. B. (1993) Thrombocytopenia in Cats: A Retrospective Study of 41 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **7**, 261-265

Klee, G. G. (1990) Performance goals for internal quality control of multichannel haematology analysers. *Clin Lab Haematol* **12 Suppl 1**, 65-74

Kondo, H., Akiyama, T., Tatsumi, N. & Nagai, Y. (2004) Performance evaluation of the complete blood count and white blood cell differential parameters obtained using a Celltac F automated hematology analyzer. *Lab Hematol* **10**, 3-13

Kondo, H., Nagai, Y., Kishita, T., Kamimura, Y., Saito, F. & Tatsumi, N. (2005) Evaluation of White Blood Cell Differential Parameters Obtained with an Automated Hematology Analyzer. *Igaku to seibutsugaku [Medicine and biology]* **149**, 281-285

Langford, K., Luchtman-Jones, L., Miller, R. & Walck, D. (2003) Performance evaluation of the Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer. *Lab Hematol* **9**, 29-37

Leers, M. P., Goertz, H., Feller, A. & Hoffmann, J. J. (2011) Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Ruby and the Sysmex XT-2000i haematology analysers. *Int J Lab Hematol* **33**,19-29

Lewis, S. M., Garvey, B., Manning, R., Sharp, S. A. & Wardle, J. (1991) Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry. *Clin Lab Haematol* **13**, 279-290

Lilliehook, I. & Tvedten, H. (2009a) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol* **38**, 163-174

Lilliehook, I. & Tvedten, H. (2009b) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet Clin Pathol* **38**, 175-182

Lilliehöök, I. & Tvedten, H. W. (2011) Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs. *Vet Clin Pathol* **40,** 450-458

Longair, I., Briggs, C. & Machin, S. J. (2011) Performance evaluation of the Celltac F haematology analyser. *Int J Lab Hematol* **33**, 357-368

Mathers, R., Evans, G., Bleby, J. & Tornow, T. (2007) Total and differential leucocyte counts in rat and mouse bronchoalveolar lavage fluids using the Sysmex XT-2000iV. *Comp Clin Path* **16**, 29-39

Mathers, R., Evans, G., Bleby, J. & Tornow, T. (2008) Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp Clin Path* **17**, 137-144

McShine, R. L., Das, P. C., Sibinga, C. T. S. & Brozović, B. (1991) Effect of EDTA on Platelet Count and Other Platelet Parameters in Blood and Blood Components Collected with CPDA-1. *Vox Sanguinis* **61**, 84-89

Mischke, R., Hrsg. (2003) Praktische Hämatologie bei Hund und Katze. Hannover: Schlütersche

Nagai, Y., Kondo, H. & Tatsumi, N. (2005) Validation of platelet counting accuracy with the celltac f automated hematology analyzer. *J Autom Methods Manag Chem* **2005**, 235-239

Norman, E. J., Barron, R. C., Nash, A. S. & Clampitt, R. B. (2001a) Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol* **30**, 137-140

Norman, E. J., Barron, R. C. J., Nash, A. S. & Clampitt, R. B. (2001b) Prevalence of Low Automated Platelet Counts in Cats: Comparison with Prevalence of Thrombocytopenia Based on Blood Smear Estimation. *Vet Clin Pathol* **30**, 137-140

Ogawa, I., Furukawa, S., Abe, M., Hagio, S., Hayashi, S. & Usuda, K. (2010) The use of an automated hematology analyzer to observe cell growth in the chromosome aberration test using human lymphocytes. *J Toxicol Sci* **35**, 923-927

Pankraz, A., Bauer, N. & Moritz, A. (2009) Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Vet Clin Pathol* **38**, 30-38

Pastor, J., Cuenca, R., Velarde, R., Vinas, L. & Lavin, S. (1997) Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. *Vet Clin Pathol* **26**, 138-147

Pedersen, H. D., Häggström, J., Olsen, L. H., Christensen, K., Selin, A., Burmeister, M. L. & Larsen, H. (2002) Idiopathic Asymptomatic Thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels Is an Autosomal Recessive Trait. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**, 169-173

Ratomski, K., Zak, J., Kasprzycka, E., Hryniewicz, K. & Wysocka, J. (2010) [The estimation of the number of platelets by different methods]. *Pol Merkur Lekarski* **28**, 379-386

Ricos C, A. V., Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M (1999) Desirable Biological Variation Database specifications

Roleff, S., Arndt, G., Bottema, B., Junker, L., Grabner, A. & Kohn, B. (2007) Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice. *Vet Clin Pathol* **36**, 155-166

Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A. & Koepke, J. A., Hrsg. (1998) Clinical Hematology : principles, procedures, correlations, 2nd edn. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Sysmex (2008) Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XT-Serie). *Sysmex Xtra* **1/2008**

Tonks, D. B. (1963) A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian laboratories. *Clinical Chem* **9**, 217-233

Toyota N, O. M., Hanaka N, Tanaka M, Oda Y (2004) Basic evaluation of hematology analyzer XT-2000i for laboratory animals. *Journal of Toxicological Sciences* **29**, 487

Tvedten, H. (2010) What is your diagnosis? Discrepancy in platelet counts determined using a Sysmex XT-2000 iV hematology analyzer. *Vet Clin Pathol.* **39**, 395-396

Tvedten H, Johansson P. (2010) Feline platelet counting with prostaglandin E1 on the Sysmex XT-2000iV. *Vet Clin Pathol*. **39,** 190-192

Tvedten, H., Lilliehöök, I., Hillström, A. & Häggström, J. (2008) Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet Clin Pathol* **37**, 266-271

Tvedten, H. W. & Lilliehöök, I. E. (2011) Canine differential leukocyte counting with the CellaVision DM96Vision, Sysmex XT-2000iV, and Advia 2120 hematology analyzers and a manual method. *Vet Clin Pathol* **40**, 324-339

Wardlaw, S. C. & Levine, R. A. (1983) Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *JAMA* **249**, 617-620

Wassmuth, A. K., Riond, B., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2011) Evaluation of the Mythic 18 hematology analyzer for use with canine, feline, and equine samples. *J Vet Diagn Invest* **23**, 436-453

Weiss, D. J., Wardrop, K. J. & Schalm, O. W. (2010) Schalm's veterinary hematology, 6th edn. Ames, Iowa:Wiley-Blackwell.

Wenger-Riggenbach, B., Hässig, M., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2006) Evaluation of the LaserCyte: an in-house hematology analyzer for dogs and cats. *Comp Clin Path* **15**, 117-129

Westgard, J. (1995) A Method Evaluation Decision Chart (MEDX Chart) for Judging Method Performance. American Society for Medical Technology, Washington DC, USA. p 7

Westgard, J. (1998) Points of Care in Using Statistics in Method Comparison Studies. *Clin Chem* **44**, 2240-2242

Westgard, J. (2003) Internal quality control: planning and implementation strategies. *Annals of Clinical Biochemistry* **40**, 593-611

Westgard, J., Carey, R. & Wold, S. (1974) Criteria for Judging Precision and Accuracy in Method Development and Evaluation. *Clin Chem* **20**, 825-833

Westgard, J., Groth, T., Aronsson, T., Falk, H. & de Verdier, C. (1977) Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection. *Clin Chem* **23**, 1857-1867

Westgard, J. & Hunt, M. (1973) Use and Interpretation of Common Statistical Tests in Method-Comparison Studies. *Clin Chem* **19**, 49-57

Westgard, J., Seehafer, J. & Barry, P. (1994) Allowable imprecision for laboratory tests based on clinical and analytical test outcome criteria. *Clin Chem* **40**, 1909-1914

Zelmanovic, D. & Hetherington, E. J. (1998) Automated Analysis of Feline Platelets in Whole Blood, Including Platelet Count, Mean Platelet Volume, and Activation State. *Vet Clin Pathol* **27**, 2-9

Zwart, A., van Assendelft, O. W., Bull, B. S., England, J. M., Lewis, S. M. & Zijlstra, W. G. (1996) Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemiglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Path* **49**, 271-274

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

IX. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Johannes Hirschberger für seine hilfreichen Anregungen und für die Bereitstellung des Themas. Die freundliche Art Mitarbeiter zu leiten und motivieren werde ich in meiner weiteren beruflichen Laufbahn stets in Erinnerung behalten.

Ich möchte mich bei Frau Professor Katrin Hartmann bedanken, da ich durch sie die Möglichkeit zur Promotion in ihrer Klinik erhalten habe.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. Karin Weber für die Betreuung und fachkompetente Unterstützung dieser Arbeit.

Meinen Eltern, die immer an mich glaubten und mich zu allen Zielen, welche ich mir je gesetzt habe ermutigten, gilt mein unendlicher Dank. Schließlich möchte ich meinem Partner Dirk danken, der mich besonders in der härtesten Phase dieser Arbeit unterstützte und mir die nötige Ruhe und Kraft verlieh.